

ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR
PRÄPARATION VON SCHWEINESCHILDDRÜSENFOLLIKELN
UND MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE
CHARAKTERISIERUNG DIESES
IN - VITRO - MODELLS

DOROTHEE STÜBNER

1985

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0077

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR PRÄPARATION
VON SCHWEINESCHILDDRÜSENFOLLIKELN
UND
MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE
CHARAKTERISIERUNG DIESES IN-VITRO-MODELLS

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
DOROTHEE STÜBNER
aus München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. K. Horn
Mitberichterstatter:	Professor Dr. E. Buchborn
Dekan:	Professor Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	5.12.1985

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Molecular and Cellular Endocrinology
40 (1985), 9 - 16

Preparation of porcine thyroid follicles
with preserved polarity:
functional and morphological properties
in comparison to inside-out follicles

GÄRTNER, R., GREIL W., STÜBNER D.,
PERMANETTER W., HORN K. and PICKARDT C.R.

Gewidmet
meinen Eltern
und
Geschwistern

Herrn Prof. Dr. med. K. Horn gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas, die konstruktive Kritik in vielen, interessanten Diskussionen, die guten Ideen und die freundliche Unterstützung bei der Zusammenstellung der Arbeit.

Herrn Dr. med. R. Gärtner und Herrn Dr. med. W. Greil danke ich herzlich für die vorbildliche Betreuung während meiner Arbeit im Labor, die Förderung selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens und die zahlreichen Anregungen und Ratschläge bei der Systematisierung der Arbeit.

Bei Frau P. Rank und Frau R. Buric bedanke ich mich besonders für die gute technische Zusammenarbeit und das herzliche und freundschaftliche Arbeitsklima.

Frau Th. Kubiczek, Frau C. Traoré, Frau M. Kewenig und Herrn J. Henner danke ich für ihre stets bereitwillige und tatkräftige Hilfe. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der endokrinologischen und klinisch-chemischen Laboratorien und allen Mitdoktoranden sei für die gute Arbeitsatmosphäre gedankt.

Frau F. Haag und Herrn A. Bauer danke ich für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
Zielsetzung	8
2. MATERIALIEN UND METHODEN	10
2.1. Verwendete Substanzen und spezielles Material	10
2.1.1. Herstellung des Kulturmediums	12
2.1.2. Vorbehandlung der Materialien für die Präparation und Inkubation der Follikel	13
2.2. Präparation isolierter Follikel mit erhaltener Polarität aus Schweineschilddrüsen ("right-side-right"-Follikel)	14
2.2.1. Prinzip der Methode	14
2.2.2. Praktische Durchführung	16
2.2.3. Methodische Vorversuche	20
2.3. Präparation von Follikeln mit umgekehrter Polari- tät aus Schweineschilddrüsen ("inside-out"-Follikel)	22
2.3.1. Prinzip der Methode	22
2.3.2. Präparation von Follikelsegmenten	22
2.4. Bedingungen der Zellkultur von isolierten Follikeln und Follikelsegmenten	24
2.4.1. Standardinkubation	24
2.4.2. Veränderung der FKS-Konzentration und des Jodidgehalts im Inkubationsmedium	25
2.4.3. Inkubation isolierter Follikel mit einer Biomatrix aus Schweineschilddrüsen	26
2.4.3.1. Präparation der Biomatrix	26
2.4.3.2. Inkubation isolierter Follikel mit Biomatrix	27
2.5. Vitalitätsprüfung	28
2.5.1. Trypanblau	28
2.5.2. Acridin-Orange/Ethidium-Bromid	28
2.6. Morphologische Techniken	29
2.6.1. Fixierung der Follikel	29
2.6.2. Histologische Technik	30

2.7.	Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der Bildung von cyclischem Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP)	30
2.7.1.	Herstellung der Testlösungen	30
2.7.2.	Inkubationsbedingungen	32
2.7.3	Radioimmunologische Bestimmung von cAMP	36
2.7.4.	Photometrische DNA-Bestimmung	38
2.8.	Aufnahme und Organifizierung von Jodid	40
2.8.1.	Aufnahme von ^{125}J	40
2.8.1.1.	Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Jodid	40
2.8.1.2.	Aufnahme von Jodid unter Zugabe von TSH und Isoproterenol	41
2.8.2.	Bestimmung des organifizierten Jods durch Trichloressigsäure-Fällung	43
2.9.	Freisetzung von Schilddrüsenhormon	43
2.9.1.	Inkubationsbedingungen für die Follikel mit erhaltener Polarität	43
2.9.2.	Inkubationsbedingungen für die Follikel mit umgekehrter Polarität	44
2.9.3.	Extraktion von T_4 aus den Proben mit Thyreoglobulin	45
2.9.4.	T_4 -Bestimmung mit Radioimmunoassay	46
3.	ERGEBNISSE	49
3.1.	Morphologie isolierter Follikel mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-Follikel)	49
3.2.	Einfluß der Biomatrix auf die Morphologie isolierter Follikel	54
3.3.	Morphologie der Follikel mit umgekehrter Polarität ("inside-out"-Follikel)	55
3.4.	Vitalität isolierter Follikel	57
3.5.	Funktionelle Untersuchungen an isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität	57
3.5.1.	Bildung von cAMP	57
3.5.1.1.	Stimulation der cAMP-Bildung mit TSH	57
3.5.1.2.	Hemmung des TSH-Effekts mit Jodid	65
3.5.1.3.	Hemmung des TSH-Effekts mit Acetylcholin	65
3.5.1.4.	Stimulation der cAMP-Bildung mit Katecholaminen	68

3.5.2. Aufnahme und Organifizierung von Jodid	71
3.5.2.1. Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Jodid in isolierte Follikel	71
3.5.2.2. Aufnahme und Organifizierung von Jodid nach Zugabe von TSH	73
3.5.2.3. Aufnahme und Organifizierung von Jodid nach Zugabe von Iso-proterenol	76
3.5.3. Untersuchung der funktionellen Differenzierung der Follikel mit erhaltener Polarität nach einem beziehungsweise sechs Tagen in Kultur	77
3.6. Funktionelle Eigenschaften isolierter Follikel mit erhaltener Polarität im Vergleich zu Follikeln mit umgekehrter Polarität	79
3.6.1. Bildung von cAMP	79
3.6.2. Aufnahme von ^{125}J	82
3.6.3. Freisetzung von Thyroxin	82
4. DISKUSSION	85
5. ZUSAMMENFASSUNG	114
6. LITERATURVERZEICHNIS	116

1. EINLEITUNG

Zur Untersuchung der spezifischen Zellfunktionen parenchymatöser Organe wie der Schilddrüse bieten sich verschiedene Modelle in vitro an:

- ganze Organe beziehungsweise große Gewebsstücke (35)
- Organschnitte (1, 20, 54)
- isolierte Organeinheiten (24, 25)
- Einzelzellen in Suspension (38)
- Monolayer aus kultivierten Einzelzellen (46, 52, 56 - 58).

Bei der Verwendung ganzer Organe, großer Gewebsstücke oder Organschnitte werden stets Interaktionen zwischen Parenchymzellen und Bindegewebszellen oder Gefäßendothelien miteerfaßt. Daher lassen sich an diesen Systemen zwar Organfunktionen, nicht aber spezifische Zellfunktionen untersuchen.

Die Isolierung von Einzelzellen und die Züchtung von Monolayern erfordert die vollständige Zerstörung der Organstruktur. Funktionelle Organuntereinheiten, wie zum Beispiel die Leberläppchen oder die Schilddrüsenfollikel, können nicht erhalten werden. Die Zellen werden aus ihrem Verband gerissen und verlieren dabei möglicherweise sowohl die differenzierte Anordnung ihrer Strukturen, als auch einen Teil ihrer spezifischen Funktionen.

Die Problematik der in-vitro-Modelle der Schilddrüse liegt darin begründet, daß die kleinste funktionelle und morphologische Einheit der Schilddrüse der Schilddrüsenfollikel ist und nicht der einzelne Thyreozyt (15). Die Besonderheit des Schilddrüsenfollikels ergibt sich aus seiner Anlage als Speichereinheit, die relativ

unabhängig von der unterschiedlichen und häufig unzureichenden Jodidzufuhr eine kontinuierliche Bereitstellung von Schilddrüsenhormonen gewährleisten soll. Diese spezielle Funktion findet ihren morphologischen Ausdruck in der Polarität des Schilddrüsenfollikels, das heißt in der gerichteten Anordnung seiner Struktur.

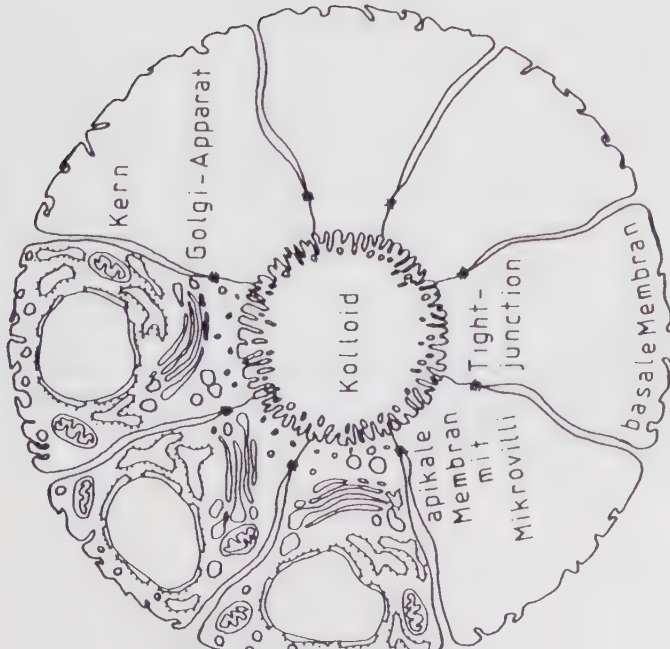
Der Schilddrüsenfollikel wird aus einzelnen Thyreozyten gebildet, die durch tight-junctions fest miteinander verbunden sind und das Lumen mit dem Kolloid umschließen (siehe Abbildung 1). Die tight-junctions trennen den apikalen Teil der Zellmembran der Thyreozyten, der zum Lumen hin gerichtet ist, vom basolateralen, äußeren Teil der Zellmembran ab.

Auch die Verteilung der Zellorganellen in den Thyreozyten zeigt eine gerichtete Anordnung. Sie spiegelt im wesentlichen den Ablauf der Synthese von Thyreoglobulin wider, die mit dem Transport in das Follikellumen verbunden ist.

So liegt das rauhe, endoplasmatische Retikulum (RER), in dem das Thyreoglobulin synthetisiert wird, zusammen mit dem Zellkern im basolateralen Teil der Zelle. Der Golgi-Apparat, zu dem das Thyreoglobulin nach seiner Synthese transportiert wird, befindet sich in der Regel apikal des Zellkerns, in der Nähe des Follikellumens. Nach seiner Glykosylierung im Golgi-Apparat wird das Thyreoglobulin dann durch Exocytose an der apikalen Zellmembran in das Follikellumen abgegeben (15).

An der apikalen Zellmembran findet nicht nur die Exocytose von neusynthetisiertem Thyreoglobulin statt, sondern auch seine endocytotische Wiederaufnahme in die Zelle. Die apikale Zellmembran besitzt Mikrovilli. Sie bildet bei der Aufnahme des Kolloids in die Zelle

"right-side-right"-Follikel



"inside-out"-Follikel

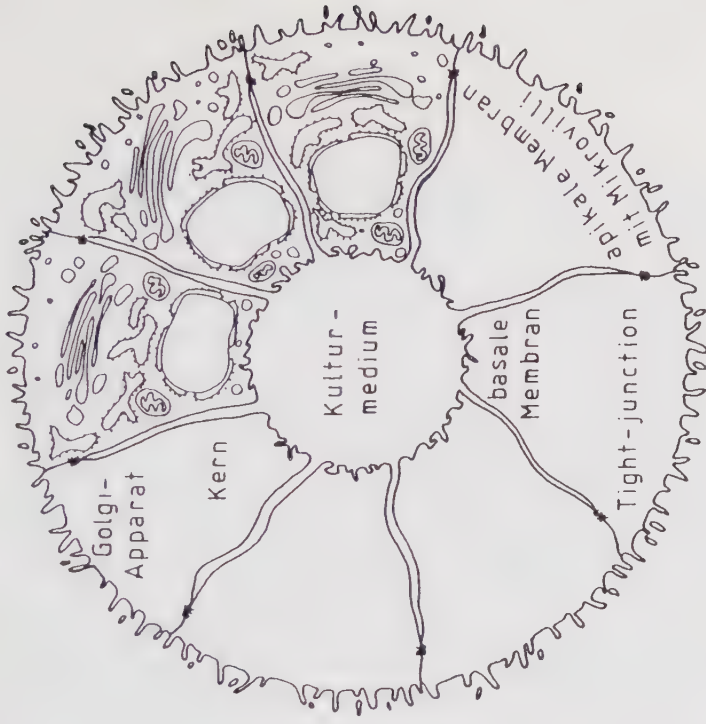


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Schnitts durch einen Follikel mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-Follikel) und durch einen Follikel mit umgekehrter Polarität ("inside-out"-Follikel).

Pseudopodien. Die dabei entstehenden, endocytotischen Vesikel verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen die Proteolyse von Thyreoglobulin stattfindet. Die Schilddrüsenhormone werden dann über die basolaterale Zellmembran, die Außenseite der Follikel, die keine Mikrovilli besitzt, in die Zirkulation abgegeben (15).

Die Follikel sind in der Schilddrüse an der basalen Seite der Zellmembran der Thyreozyten zusätzlich von einer Basalmembran umschlossen, die aus Laminin, Fibronectin und Kollagen besteht (17, 47). Zwischen den einzelnen Follikeln liegen Bindegewebe, Fibroblasten, Blutgefäße, Nerven und parafollikuläre C-Zellen.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich damit beschäftigt, den Schilddrüsenfollikel aus diesem Gewebsverband zu lösen und so die kleinste funktionelle Einheit der Schilddrüse in Kultur als in-vitro-Modell zu gewinnen.

Die ersten Versuche begannen damit, die Bildung follikelähnlicher Strukturen in Kulturen von Schilddrüsenzellen zu induzieren. KERKOF et al. konnten 1964 zeigen, daß die Zugabe von TSH zu Monolayer-Kulturen von Schafschilddrüsenzellen zu einer Reorganisation der Zellen und Ausbildung follikelähnlicher Strukturen führte (31). Auch an Schweineschilddrüsenzellen in Monolayer- und in Suspensionskultur konnte die Bildung von solchen Strukturen unter dem Einfluß von TSH nachgewiesen werden (16, 29, 38). Andere Arbeitsgruppen isolierten keine Einzelzellen, sondern präparierten und kultivierten Aggregate von Thyreozyten verschiedener Spezies. Diese Follikelsegmente bildeten in Kultur wieder geschlossene Follikel (22, 25, 30, 43).

Schließlich gab es auch Versuche, von vorneherein ganze, geschlossene Follikel zu isolieren.

DENEFF et al. gelang es 1980 bei Präparationen aus Schilddrüsen von Ratte, Schwein und Mensch eine Mischung von geschlossenen Follikeln und Follikelsegmenten, den Wandfragmenten aufgerissener Follikel, zu gewinnen (9).

Ein zentrales Problem bei der Präparation und Kultivierung isolierter Schilddrüsenfollikel ist die Tendenz dieser Follikel, ihre Polarität umzukehren. Im Gegensatz zu den Follikeln mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-Follikel) umschließt bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität ("inside-out"-Follikel) die basolaterale Zellmembran das Lumen, während der apikale, Mikrovilli tragende Teil der Zellmembran zum Medium hin gerichtet ist (siehe Abbildung 1). Auch die Anordnung der Zellorganellen ist entsprechend verändert, sodaß der Zellkern wieder nahe der basolateralen Membran, also jetzt in der Nähe des Lumens, liegt und der Golgi-Apparat apikal zum Medium hin orientiert ist.

Die Follikel mit umgekehrter Polarität enthalten kein Kolloid und besitzen keine Basalmembran.

Die Ursachen für die Änderung der Polarität von Schilddrüsenfollikeln in Kultur sind ungeklärt.

Die von einigen Arbeitsgruppen beobachtete Abhängigkeit der Ausrichtung der Polarität von den Kulturbedingungen konnte nicht von allen Autoren nachvollzogen werden.

NITSCH et al. (44) und HANAFUSA et al. (22) erhielten bei der Kultur von Follikelsegmenten aus Ratten- beziehungsweise menschlichen Schilddrüsen zuerst Schilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität, die dann nach Erhöhung der Konzentration an fötalem Kalbsserum (FKS) im

Kulturmedium von 0.5 % auf 5 % beziehungsweise 10 % ihre Polarität innerhalb von drei bis fünf Tagen beziehungsweise 24 Stunden umkehrten.

Dagegen fanden HERZOG und MILLER (25), daß sich aus ihren isolierten Follikelsegmenten aus Schweineschilddrüsen anscheinend unabhängig von den Kulturbedingungen sowohl in Medium mit, als auch ohne 10 % FKS stets Follikel mit umgekehrter Polarität bildeten. Sie machten jedoch die Entdeckung, daß sie bei der Verwendung von Rattenschilddrüsen bei ihrer Präparationsmethode zuerst intakte Follikel mit erhaltener Polarität erhielten (24). Diese ganzen Follikel mußten sie dann durch zusätzliches Pipettieren aufbrechen, um wieder Follikelsegmente zu erhalten. Die kleinen Rattenschilddrüsenfollikel ließen sich also im Gegensatz zu den wesentlich größeren Schweineschilddrüsenfollikeln als geschlossene Follikel mit erhaltener Polarität isolieren, solange sie nicht durch die Anwendung zusätzlicher Scherkräfte aufgerissen wurden.

Nicht nur die Ursache für die Entstehung von Schilddrüsenfollikeln mit umgekehrter Polarität in Kultur, sondern auch der Mechanismus der Polaritätsänderung ist noch unklar. Auf Grund der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sind im wesentlichen zwei Möglichkeiten denkbar:

Der Ablauf der Polaritätsänderung bei Schilddrüsenfollikeln von Ratte beziehungsweise Mensch in Kultur konnte nach Erhöhung der FKS-Konzentration im Kulturmedium von 0.5 % auf 5 % beziehungsweise 10 % anhand elektronenoptischer Bilder aufgezeigt werden (23, 44). Während der Umkehrung der Polarität blieben die Zellen im Follikelverband miteinander in Kontakt. Zuerst er-

schienen Mikrovilli an der dem Medium zugewandten Seite der Follikel. Dann änderte sich die Verteilung der Zellorganellen. Die tight-junctions und Mikrovilli an der luminalen Seite der Follikel verschwanden nach der Umverteilung der Zellorganellen. Erst jetzt war auch kein Kolloid mehr im Lumen zu sehen (44). Der erste mögliche Mechanismus der Polaritätsänderung von Schilddrüsenfollikeln ist also die Umorganisation der Struktur intakter Follikel mit erhaltener Polarität.

HERZOG und MILLER (25) kultivierten Follikelsegmente und erhielten nach 24 Stunden Inkubation nur Follikel mit umgekehrter Polarität. Sie fanden im Lumen dieser Follikel teilweise Einzelzellen oder Reste toter Zellen eingeschlossen. Diese Beobachtung führt zu einer zweiten Möglichkeit der Entstehung von Schilddrüsenfollikeln mit umgekehrter Polarität, nämlich der Neubildung aus Follikelsegmenten.

Es ist denkbar, daß sich entweder unterschiedlich große Segmente aufgerissener Follikel mit erhaltener Polarität umgekehrt, mit der basolateralen Seite nach innen und der apikalen Seite nach außen neu zusammenschließen, oder daß sich aufgerissene Follikel mit erhaltener Polarität umstülpen und wieder verschließen.

In Abhängigkeit von der Fragestellung bei der Untersuchung der Schilddrüse können entweder Follikel mit umgekehrter oder mit erhaltener Polarität ein geeignetes in-vitro-Modell darstellen. Die Follikel mit umgekehrter Polarität bieten einen idealen Zugang zur apikalen Membran und ermöglichen zum Beispiel eine genaue Untersuchung von Endocytosevorgängen (24, 26).

Bei Follikeln mit erhaltener, stabiler Polarität liegt die kleinste funktionelle Einheit der Schilddrüse wie in vivo vor. Dieses Modell eignet sich daher gut, um in vitro verschiedene Funktionen der Schilddrüse unbeeinflusst von anderen Zellen, wie zum Beispiel Endothelien oder Fibroblasten, zu untersuchen.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Präparation von Schilddrüsenfollikeln mit erhaltener Polarität. Diese isolierten Schilddrüsenfollikel sollten nicht nur die Untersuchung spezifischer Funktionen der Schilddrüsenzellen in vitro ermöglichen, sondern auch die Erforschung des Wachstums der Schilddrüsenzellen, ohne die Einzelzellen aus ihrem funktionellen Verband zu lösen. Daher sollte die Stabilität der isolierten Schilddrüsenfollikel über einen Zeitraum von mehreren Tagen in Kultur erreicht werden.

Als Ausgangsmaterial für unsere Versuche wählten wir Schweineschilddrüsen, da diese einfach vom Schlachthof zu erhalten waren. Bei der Entwicklung der Präparationsmethode sollte die Morphologie und Vitalität der Schilddrüsenfollikel durch histologische Schnitte und Vitalfärbungen untersucht werden. Zur Überprüfung der funktionellen Intaktheit des Modells sollten an den isolierten Schweineschilddrüsenfollikeln mit erhaltener Polarität bekannte Funktionen und Regulationswege der Schilddrüse experimentell nachvollzogen werden. Es sollte der Einfluß von TSH, Jodid, adrenergen und cholinergen Substanzen auf die Bildung von cyclischem Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) untersucht werden, außerdem die Aufnahme und Organifizierung von Jodid und die Freisetzung von Schilddrüsenhormon.

Eine zusätzliche Fragestellung war die Lokalisation von Hormonrezeptoren und der "Jodpumpe" im apikalen und/oder basolateralen Teil der Zellmembran der Thyreozyten. Eine vergleichende Untersuchung der cAMP-Bildung, der Aufnahme von Jodid und der Freisetzung von Schilddrüsenhormon an isolierten Schweineschilddrüsenfollikeln mit erhaltener und mit umgekehrter Polarität sollte eine Antwort auf diese Frage geben.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Verwendete Substanzen und spezielles Material

Sustanzen

Boehringer Mannheim:

Minimal essential medium (MEM, Earle), Kollagenase (Clostridium histolyticum), Penicillin/Streptomycin, Kalbsthymus DNA, 0,5 %ige Trypanblau-Lösung in 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung.

Serva Heidelberg:

Fötales Kalbsserum (FKS), Silikonlösung.

Flow-Laboratories GmbH Bonn:

Amphotericin B.

Sigma Chemie Taufkirchen:

Soy-Bean-Trypsin-Inhibitor, bovines TSH (bTSH), 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX), Adrenalin, Noradrenalin, Isoproterenol, DL-Propranolol, Acetylcholin-Chlorid, Acridin-Orange, Ethidium-Bromid, Lauryl-Sulfat, Desoxyribonuklease II (DNAase II) Typ IV (Schweinemilz).

Merck Darmstadt:

Proteinase K.

Becton & Dickinson Heidelberg:

Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)-Radioimmunoassay (RIA)-Kit.

Alle übrigen, nicht einzeln aufgeführten Substanzen waren von der Firma Merck Darmstadt.

Material

Abbot Ireland:

Venenkatheter Abbocath-T 20 G.

Bender & Hobein München:

Polyallomer-Reagenzröhrchen (Centrifuge tubes)
Beckman, Glasröhrchen mit Bördelrand für die
cAMP-Extraktion (16 x 100 mm) Hecht Assistent,
Pasteurpipetten Brand.

Nunc Wiesbaden:

Pipettenstopfwatte.

Franz Eckert & Cie AG Waldkirch/Breisgau:

Nybolt Filtergaze.

Schleicher & Schüll Dassel:

Einmal-Filterhalter (FP 030/3; 0,2 μ m; Rotrand).

Heraeus Hanau:

Petriperm - Schalen (hydrophob).

Flow-Laboratories GmbH Bonn:

Kleine Petrischalen (tissue culture petri plate,
30 x 10 mm).

Schott Mainz:

Schliffgläser mit Normalschliff-Stopfen
(16 x 100 mm, Duran).

Pharmacia Uppsala Schweden:

Sephadex G-25 superfine.

2.1.1. Herstellung des Kulturmediums

9,78 g Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, 1,0 g Glukose und 100 mg Soy-Bean-Trypsin-Inhibitor werden in ca. 800 - 900 ml sterilem Aqua dest. gelöst. Es werden 2,2 g Natrium-Bikarbonat zugegeben und nach erneutem Mischen je 2 ml einer Lösung von Penicillin und Streptomycin (50 000 U/ml Penicillin, 0,05 g/ml Streptomycin) und einer Lösung von Amphotericin B (250 µg/ml). Abschließend wird mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und das Medium nochmals zur gleichmäßigen Verteilung aller Substanzen gerührt.

Die Endkonzentrationen betragen 100 U/ml für Penicillin, 100 µg/ml für Streptomycin und 0,5 µg/ml für Amphotericin B.

Für diese Antibiotika-Zusätze wurden immer eine Ampulle Penicillin/Streptomycin und eine Ampulle Amphotericin B in je 10 ml sterilem Aqua dest. gelöst und steril portioniert à 1 ml bei -20°C gelagert.

Der pH-Wert wurde vor Gebrauch des Mediums am pH-Meter (pH Digi 510 Wiss.-Techn.-Werkstätten, Weilheim) mit CO₂-Gas auf 7,4 eingestellt.

Das fertige Medium (MEM) wurde im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt unter ständiger Begasung mit Carbogen (95 % O₂; 5 % CO₂) zur fortlaufenden Einstellung des pH bei 7,4.

2.1.2. Vorbehandlung der Materialien für die Präparation und Inkubation der Follikel

An den Glasgegenständen, die bei der Präparation verwendet werden, wie Petrischalen, Inkubationsgefäße, Pasteurpipetten und Reagenzgläser, dürfen keine Reste von Detergens sein. Sie werden daher in Alkohol gereinigt und mit Aqua dest. nachgespült. Außerdem werden alle Glasgegenstände, die direkt mit den Follikeln in Berührung kommen, nur frisch silikonisiert verwendet, um das Anhaften der Follikel zu verringern.

Die Pasteurpipetten müssen besonders vorbereitet werden, um die isolierten Follikel nicht beim Pipettieren zu beschädigen. Die Spitzen der Pasteurpipetten werden abgeflammt, um scharfe Kanten zu entfernen, die Öffnungen werden ausgemessen und nach den Öffnungsdurchmessern in Gruppen von 1500, 1000, 800 und 600 μm geordnet. Diese Pipetten werden dann mit Aqua dest. gespült, getrocknet und silikonisiert für die Präparation der Follikel und Follikelsegmente. Ein Teil dieser so vorbehandelten Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser über 1000 μm wird zusätzlich mit Pfropfen aus Pipettenstopfwatte als Luftfilter versehen und sterilisiert.

Die Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) für die Inkubationen der Follikel im Wasserbad werden silikonisiert und sterilisiert.

2.2. Präparation isolierter Follikel mit erhaltener Polarität aus Schweineschilddrüsen ("right-side-right"-Follikel)

2.2.1. Prinzip der Methode

Bei der hier dargestellten, von uns entwickelten Präparationsmethode wird in die Arterie einer Schweineschilddrüse Kollagenaselösung eingespritzt. Die ganze Drüse wird inkubiert und anschließend in Medium zerkleinert. Auf diese Weise werden die intakten Schilddrüsenfollikel während der Inkubation durch die Kollagenase aus ihrem Bindegewebsgerüst gelöst. Beim Zerteilen der Schilddrüse in Medium werden sie dann freigesetzt. Die Verdauung des perifollikulären Gewebes durch die infundierte Kollagenase geschieht also bereits vor der Zerkleinerung der Schilddrüse.

Hierdurch soll die Basalmembran der Follikel wenigstens zum Teil erhalten werden, da sie möglicherweise für die Stabilität des polaren Aufbaus der Follikel entscheidend ist.

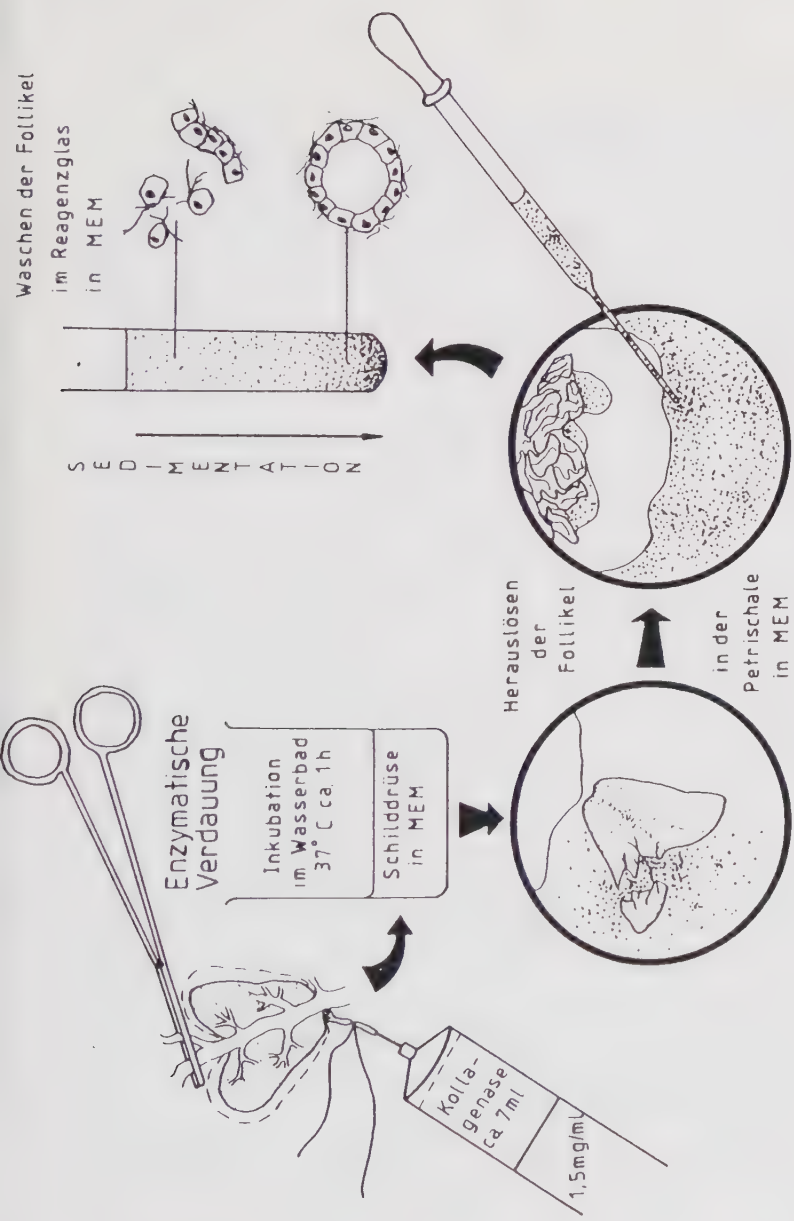


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Präparation isolierter Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-Follikel).

2.2.2. Praktische Durchführung

Die Schilddrüsen frisch geschlachteter Schweine (60 - 80 kg) werden vom Schlachthof geholt und sofort auf Eis gelegt. Beim Herausnehmen der Schilddrüsen dürfen die zuführenden Gefäße nicht abgerissen werden. Daher werden die Drüsen zusammen mit dem sie umgebenden Binde- und Fettgewebe entfernt.

Von der Tötung der Tiere mit Elektroschock, dem Entbluten und Zerteilen bis zur Lagerung der Schilddrüsen auf Eis vergehen ca. 20 Minuten. Die Präparation beginnt ca. 30 Minuten später. Sie findet im Labor bei Raumtemperatur statt.

Die Hauptarterie, die sich bei der Schweineschilddrüse am unteren Pol befindet, wird aufgesucht. Die größte, oberflächlich abführende Vene läßt sich dabei als Leitstruktur benutzen, um die in der Tiefe meist hinter oder knapp neben ihr liegende Arterie zu finden. Manchmal ist auch ein direkter Abgang einer Schilddrüsenarterie aus der A. Carotis erhalten geblieben. Die Arterie wird mit einem flexiblen Venenkatheter (Abbocath-T 20G) kanüliert. Der Katheter wird mit Zwirnfaden fixiert und die Schilddrüse wird stumpf aus dem umgebenden Muskel- und Bindegewebe herausgelöst. Die Bindegewebskapsel der Schilddrüse selbst wird nicht entfernt. Weitere zu- und abführende Gefäße werden abgeklemmt (siehe Abbildung 2).

Es wird zunächst eine möglichst kleine Probemenge MEM, ca. 2 - 4 ml, in die Schilddrüse gespritzt zur Prüfung des Gefäßzugangs. Leckstellen, die sich dabei zeigen, werden abgeklemmt.

Danach werden ca. 5 - 10 ml Kollagenaselösung (1,5 mg Kollagenase/ml MEM) in die Schilddrüse gespritzt. Der Teil der Schilddrüse, der von der kanülierten Arterie versorgt wird, bläht sich dabei bis auf das Doppelte seines Ausgangsvolumens auf.

Die Schilddrüse wird in ein Reagenzglas in MEM gelegt und im Wasserbad bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Nach der Inkubation mit Kollagenase werden das restliche grobe Bindegewebe, die großen Gefäße und das Fett sorgfältig entfernt.

Die Schilddrüse wird durch die Verdauung des Bindegewebes weich und zerfließlich und bekommt eine ockergelbe Farbe, bis auf einige mehr oder weniger große Bezirke in jeder Drüse, die ihre ursprüngliche, härtere Konsistenz und dunklere Färbung behalten. Es handelt sich dabei um Stellen, in die keine Kollagenaselösung eingespritzt werden konnte, zum Beispiel weil sie von einem anderen Gefäß versorgt wurden oder weil das versorgende Gefäß hier thrombotisch verschlossen war. Aus diesen Teilen lassen sich natürlich keine intakten Follikel herauslösen. Das Schilddrüsengewebe wird in eine silikonisierte Petrischale in MEM gelegt und zerteilt. Gut verdautes, weiches Gewebe wird mit zwei Pinzetten vorsichtig entlang der Bindegewebssepten auseinandergezogen. Dabei läßt sich auf einer dunklen Unterlage erkennen, wie sich die herausgelösten Schilddrüsenfollikel im Medium als feiner Gries verteilen.

Das Medium mit den Follikeln, Follikelsegmenten, Einzelzellen und Kollagenfasern wird mit einer Pasteurpipette (Öffnungsdurchmesser 1 mm) in Polyallomer-Reagenzröhrchen (15 ml) überführt. Die Gewebstückchen und groberen Bindegewebsflocken bleiben in der Petrischale zurück. Sie werden noch ein zweitesmal vorsichtig in MEM ge-

schüttelt, da hierbei häufig noch viele Follikel zu gewinnen sind. Auch diese Suspension wird vom Gewebe getrennt in Polyallomerröhrchen überpipettiert. Das Pipettieren mit den Pasteurpipetten (Öffnungsdurchmesser 1 mm) muß vorsichtig geschehen, damit intakte Follikel nicht aufgebrochen werden.

Aus der Suspension in den Polyallomerröhrchen werden dann nochmals nachträglich mit der Pasteurpipette alle größeren Aggregate von Follikeln und Bindegewebssteilen herausgefischt. Die verbleibende Mischung aus Follikeln, Follikelsegmenten, Einzelzellen und Kollagenfasern in MEM wird gleichmäßig durchpipettiert. Danach läßt man sie zweieinhalb Minuten absedimentieren.

In dieser Zeit setzen sich alle weitgehend intakten Follikel mit und ohne Kolloid am Boden des Reagenzröhrchens ab, während Fetttröpfchen, einzelne Zellen und Follikelwandfragmente darüber schwimmen und abpipettiert werden können. Danach wird mit frischem MEM aufgefüllt, wieder mit der Pipette durchmischt und größere Teile, Aggregate und Bindegewebe, entfernt, bevor erneut das Absedimentieren für zweieinhalb Minuten folgt.

Die Follikel werden insgesamt zweimal in den Polyallomer-Reagenzröhrchen gewaschen, um die Kollagenase und die gröbsten Verunreinigungen zu entfernen. Danach wird aus jedem Röhrchen eine Probe unter dem Lichtmikroskop (Fa. Will, Wetzlar; Vergrößerung 1: 150) betrachtet. Suspensionen mit überwiegend stark deformierten Follikeln und Bruchstücken werden von vorneherein aussortiert oder nochmals gewaschen und kontrolliert. Bei sehr fettreichen Schilddrüsen kann das Absetzen der Follikel stark verlangsamt sein. Hat sich nach fünf Minuten aber noch kein gut sichtbares Pellet₁₃ gebildet, wird das Röhrchen verworfen. Unter dem Mikroskop finden sich in solchen Suspensionen kaum intakte Follikel.

Die so überprüften Follikel werden nun zur Keimreduktion und zur weiteren Reinigung von Einzelzellen und Follikel-segmenten fünfmal steril unter dem Laminar-Air-Flow (CEAG Verfahrenstechnik, Selm-Bork) gewaschen. Sie werden dazu aus den Polyallomerröhrchen möglichst gleichmäßig verteilt in sterile, silikonisierte Glasröhrchen (12 ml) pipettiert. Das zum Waschen verwendete Medium (MEM) wird aus einer Einmalspritze mit Sterilfilter zugegeben. Die Standard-Sedimentationszeit von zweieinhalb Minuten kann je nach Follikelmenge und Menge des zum Waschen aufgefüllten Mediums zwischen zwei- und dreieinhalb Minuten variiert werden. Gerade bei diesen Waschschritten ist darauf zu achten, daß sehr schonend mit der Pasteurpipette (Öffnungsdurchmesser 1 mm) pipettiert wird, um nicht die intakten Follikel mechanisch zu schädigen.

Nach der zweiten und nach der vierten Zugabe von sterilgefiltertem Medium werden sowohl die Reagenzgläser, als auch die Pasteurpipette gewechselt. Nach der fünften Medium-Auffüllung werden die Follikel je nach Ausbeute auf ein bis drei graduierte Reagenzgläser verteilt. Das Medium wird möglichst vollständig abpipettiert. Nach einer Standzeit von etwa fünf Minuten läßt sich mittels der Graduierung die Ausbeute an sedimentierten Follikeln grob in Millilitern bestimmen. Bei einer Präparation von acht bis zwölf Schilddrüsen liegt sie meist zwischen 1.0 und 2.5 ml sedimentierter Follikel.

2.2.3. Methodische Vorversuche

Zu Beginn der Entwicklung der Präparationsmethode isolierter Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität ließen wir die Follikel beim Waschen nicht einfach absedimentieren, sondern zentrifugierten sie. Außerdem wurden die Follikel zweimal durch Nylonnetze filtriert.

Durch diese beiden Maßnahmen sollte eine bessere Reinigung der Follikel erzielt werden. Besonders das an den Follikeln anhaftende Bindegewebe, das ihre Tendenz zur Aggregatbildung verstärkt, sollte durch die Filtration über die Nylonnetze entfernt werden, da Nylon Kollagen adsorbiert.

Der Ablauf der unter 2.2.2. beschriebenen Präparationsmethode isolierter Follikel war bis zum ersten unsterilen Waschen unverändert. Die Suspension aus Follikeln, Follikelsegmenten, Einzelzellen und Bindegewebsflocken in den Polyallomer-Reagenzröhrchen wurde nun sowohl bei den zwei unsterilen, als auch bei den fünf sterilen Waschdurchgängen zur Abtrennung der intakten Follikel jeweils 30 Sekunden bei 75 g zentrifugiert (Sarstedt Thrombo-Zentrifuge). Der Überstand mit den Einzelzellen und Follikelsegmenten wurde mit der Pasteurpipette abgehoben und das Pellet mit den Follikeln wieder in frischem Medium suspendiert.

Zusätzlich wurden die Follikel zweimal, jeweils nach den beiden unsterilen Waschdurchgängen, über ein 500 µm ultraschallgereinigtes (Gerät Labsonic 1510, Fa. B. Braun) Nylonnetz filtriert. Dabei blieben grobe Bindegewebsstücke, Follikelaggregate und Kollagenfasern im Netz hängen. Das Filtrat mit den Follikeln (durchschnittlicher Durchmesser 200 µm), Follikelsegmenten und Einzelzellen wurde dann weiter gewaschen und zentrifugiert.

Bei den fünf sterilen Waschschritten unter dem Laminar-Air-Flow wurden die Reagenzgläser für die Zentrifugation mit steriler Aluminiumfolie verschlossen. Die weitere Behandlung der Follikel, wie das Abheben des Überstandes mit einer Pasteurpipette, das Auffüllen mit frischem Medium aus einer Einmalspritze mit Sterilfilter und das vorsichtige Durchmischen der Follikel im frischen Medium, wurde wie unter 2.2.2. bereits beschrieben, durchgeführt.

Die Ausbeute an Follikeln mit erhaltener Polarität war bei diesen Vorversuchen deutlich geringer, als bei der unter 2.2.2. beschriebenen endgültigen Methode. Neben intakten Follikeln fand sich ein größerer Anteil an aufgerissenen Follikeln und Follikelsegmenten in der Suspension.

Die polare Struktur der filtrierten und zentrifugierten Follikel erwies sich als sehr instabil. Bereits nach 20 Stunden Inkubation in Medium mit 1 % FKS lagen zum überwiegenden Teil Follikel mit umgekehrter Polarität vor.

Das Absedimentieren zusammen mit dem Herauslesen größerer Aggregate und Bindegewebsteile von Hand mit einer Pipette erwies sich also bei der Isolierung und Reinigung der Follikel als wesentlich schonender und effektiver als das Zentrifugieren und Filtrieren.

Ursächlich läßt sich einmal vermuten, daß die Zentrifugation die Follikel mechanisch schädigte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet die Adsorption des Kollagens an die Nylonnetze. Dadurch blieben bei dieser Methode, bei der möglichst gut gereinigte Follikel ohne anhaftendes Bindegewebe erhalten werden sollten, offensichtlich gerade die intakten Follikel in großer Zahl im Netz hängen.

2.3. Präparation von Follikeln mit umgekehrter Polarität aus Schweineschilddrüsen ("inside-out"-Follikel)

2.3.1. Prinzip der Methode

Die Präparation von Follikeln mit umgekehrter Polarität führten wir nach der Methode von HERZOG und MILLER durch (24, 25). An erster Stelle steht bei dieser Methode die mechanische Zerkleinerung des Schilddrüsengewebes. Erst danach folgt die Verdauung des perifollikulären Gewebes durch Inkubation der Schilddrüsenstückchen in einer Kollagenaselösung. Durch kräftiges Pipettieren werden nach der Inkubation Follikelwandfragmente aus dem Gewebe gelöst und ganze Follikel aufgebrochen. Die Follikelsegmente werden durch Filtrieren und Waschen isoliert. Bei dieser Methode wird die Basalmembran der Follikel durch die Kollagenase vollständig entfernt (17, 18, 25, 43). Die Reorganisation der Follikelsegmente zu Follikeln mit umgekehrter Polarität erfolgt während der anschließenden 24 stündigen Inkubation im Brutschrank.

2.3.2. Präparation von Follikelsegmenten

Eine ausführliche Beschreibung der im folgenden kurz skizzierten Methode findet sich bei HERZOG und MILLER (24, 25).

Schweineschilddrüsen werden sorgfältig von Binde- und Fettgewebe und allen Gefäßen befreit und mit Rasierklingen in kleinste Stückchen geschnitten, solange bis das Gewebe eine breiartige Konsistenz erreicht hat. Das Bindegewebe, das man an seiner weißlichen Farbe gut er-

kennt, wird wieder möglichst weitgehend entfernt. Das fein zerkleinerte Schilddrüsengewebe wird in 20 ml Erlenmeyer-Kolben gesammelt und im Verhältnis 1:1 in Kollagenaselösung (1 mg Kollagenase/ml MEM) 30 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Das verdauete Gewebe wird mit Pasteurpipetten mit abnehmendem Öffnungsdurchmesser (1500, 1000, 800 und 600 µm) durchpipetiert, um die Follikel aus dem Gewebe zu lösen. Bei diesem Vorgang werden die relativ großen Schweineschilddrüsenfollikel (durchschnittlicher Durchmesser 200 µm) größtenteils aufgerissen, sodaß Follikelwandfragmente entstehen. Nach dem letzten Pipettierdurchgang wird die ganze Mischung durch 250 µm und 200 µm ultraschallgereinigte (Gerät Labsonic 1510, Firma B. Braun) Nylonnetze filtriert, um die Follikelsegmente zu isolieren. Größere Gewebereste, Bindegewebe und ganze Follikel bleiben im Netz hängen. Die Einzelzellen werden wieder durch Waschen entfernt. Dazu wird die gefilterte Suspension aus Follikelsegmenten unterschiedlicher Größe und Einzelzellen in Reagenzgläser abgefüllt und 30 Sekunden bei 75 g zentrifugiert (Sarstedt Thrombo-Zentrifuge). Der Überstand mit den Einzelzellen und kleineren Zellverbänden wird abgehoben und das Pellet aus Follikelsegmenten in frischem Medium resuspendiert. Insgesamt werden die Follikelsegmente zweimal unsteril und fünfmal steril unter dem Laminar-Air-Flow gewaschen, analog zur Behandlung isolierter Follikel mit erhaltener Polarität.

Die Ausbeute an Follikelsegmenten ist verglichen mit der Ausbeute an isolierten Follikeln wesentlich geringer bei einem vergleichbaren Arbeitsaufwand für die beiden Präparationsmethoden.

2.4. Bedingungen der Zellkultur von isolierten Follikeln und Follikelsegmenten

2.4.1. Standardinkubation

Isolierte Follikel und Follikelsegmente wurden unter identischen Bedingungen inkubiert.

Jeweils 0,1 ml sedimentierte Follikel beziehungsweise 0,1 ml zentrifugierte Follikelsegmente werden in 1 ml sterilgefiltertem Kulturmedium (MEM) in graduierten Reagenzgläsern aufgenommen. Die Follikel beziehungsweise Follikelsegmente werden mit der Pasteurpipette gleichmäßig in dem Kulturmedium durchmischt und auf sterile, hydrophobe Petriperm-Schalen à 1 ml verteilt (DNA-Menge pro Schale zwischen 60 und 120 µg). Danach wird jede Schale mit weiteren 4 ml Kulturmedium aufgefüllt und fötales Kalbsserum (FKS; Endkonzentration 1 %) dazugegeben.

Der Boden der Petriperm-Schalen besteht aus einer hydrophoben Membran, die ein Anhaften der Follikel oder Follikelsegmente vermindert.

Die Follikel beziehungsweise Follikelsegmente werden durch sanftes Hin- und Herschwenken der Schalen gleichmäßig über den Boden verteilt. Dabei muß man rotierende Bewegungen der Kulturschale vermeiden, da sich die Follikel und auch die Follikelsegmente sonst in der Mitte der Schale ansammeln und Aggregate bilden. Zur Verminderung der Aggregatbildung kann man die Follikel allerdings auch in den Schalen nochmals nach ca. einer Stunde Inkubation im Brutschrank durch sanftes Schwenken neu verteilen oder mit einer Pasteurpipette durchmischen.

Danach werden sowohl die Follikel, als auch die Follikel-segmente etwa 20 Stunden im Brutschrank (Napco, No. 5100, National Appliance Company) bei 37°C, 95 % Luft- und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Unter diesen Bedingungen stellt sich ein pH-Wert von 7,4 in den Petriperm-Schalen ein.

Während dieser 20stündigen Ruhephase schließen sich kleinere Defekte in der Wand isolierter Follikel mit erhaltener Polarität. Die Follikel mit umgekehrter Polarität bilden sich in dieser Zeit erst aus den Follikelsegmenten (25).

2.4.2. Veränderung der FKS-Konzentration und des Jodidgehalts im Inkubationsmedium

Zur Überprüfung der Stabilität der polaren Struktur isolierter Follikel in vitro wurde eine sechstägige Inkubation sowohl mit der Standardkonzentration von 1 % fötalem Kalbsserum (FKS) im Kulturmedium, als auch mit einer hohen Konzentration von 5 % FKS im Kulturmedium durchgeführt. Die anderen Inkubationsbedingungen wurden nicht verändert. Die Follikel wurden am Ende der Inkubation histologisch untersucht.

Die bekannte, negative Regulation der Schilddrüse durch die Jodid-Zufuhr wurde an den Follikel mit erhaltener Polarität anhand der Stimulierbarkeit der cAMP-Bildung mit TSH nach einer Vorinkubation mit Jodid nachvollzogen. Dazu wurden isolierte Follikel sofort nach ihrer Extraktion aus dem Gewebe in MEM mit einem Zusatz von 1 % FKS und 1 µM KJ aufgenommen und 20 Stunden in diesem jodidhaltigen Medium im Brutschrank, wie beschrieben, inkubiert. Die Stimulierbarkeit der cAMP-Bildung mit TSH wurde dann vergleichend sowohl bei den mit Jodid vorinkubierten Follikeln, als auch bei jodidfrei, unter Standardbedingungen vorinkubierten Follikeln in einem Langzeitversuch über zwei und vier Stunden in Medium mit 1 % FKS und 1 mM IBMX untersucht.

2.4.3. Inkubation isolierter Follikel mit einer Biomatrix aus Schweineschilddrüsen

2.4.3.1. Präparation der Biomatrix

Zur Stabilisierung der polaren Struktur frisch isolierter, filtrierter und zentrifugierter Follikel (siehe 2.2.3.) wurde dem Inkubationsmedium bei einem Teil der Vorversuche eine Bindegewebsbiomatrix aus Schweineschilddrüsen zugefügt.

Diese Matrix, die in Anlehnung an die Methode von ROJKIND et al. hergestellt wurde, enthält Basalmembrankomponenten und Grundsubstanz und besteht vorwiegend aus Kollagen Typ I und III, geringen Mengen Kollagen Typ IV, Fibronectin und Glykosaminoglykanen (47). DNA, Lipide und lösliche Komponenten werden bei der Isolierung der Bindegewebsfasern entfernt.

Kleingehacktes Schweineschilddrüsen-gewebe von ca. acht Drüsen (etwa 75 g) wurde im Waring Blender unter Eiskühlung in ca. 100 - 150 ml kaltem Aqua dest. weiter zerkleinert und anschließend durch ein 800 µm Nylonnetz filtriert. Das im Netz zurückbleibende Material wurde mit 200 ml Aqua dest. aus dem Netz ausgewaschen, eine Stunde bei 4°C gerührt und danach erneut filtriert. Diesmal wurde das wieder im Netz verbliebene Material mit 1.0 M NaCl-Lösung ausgewaschen und nochmals eine Stunde bei 4°C gerührt. Nach einer dritten Filtration wurde das Material in 30 ml serumfreiem Medium mit einem Zusatz von 1 mg DNAase II aufgenommen und darin eine Stunde bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert. Danach wurde wieder filtriert, das Material 30 Minuten lang mit Medium gespült, erneut filtriert und in 50 ml Aqua dest. suspendiert. Zur Lipidex-

traktion wurde ein gleiches Volumen von 50 ml Butanol/Äther-Gemisch (40 : 60, V/V) zu der Suspension dazugegeben. Diese Mischung wurde 30 Minuten lang alle fünf Minuten aufgeschüttelt und abschließend wieder filtriert. Das so gewonnene Material, die endgültige Biomatrix, wurde dreimal in je 250 ml Aqua dest. und fünfmal in sterilem MEM gewaschen. Ein Teil dieser Biomatrix in MEM wurde lyophilisiert (Lyophilisator, Christ Heraeus). Der andere Teil wurde sofort portioniert und bei -20°C eingefroren.

2.4.3.2. Inkubation isolierter Follikel mit Biomatrix

Die Biomatrix wurde nur bei den unter Vorversuchen beschriebenen, durch Filtration und Zentrifugation gereinigten Follikeln (siehe 2.2.3.) eingesetzt.

Es wurden jeweils 200 - 400 µl der sterilen Matrix-Lösung, Schweineschilddrüsen-Biomatrix in MEM, zu 0,1 ml Follikeln in 5 ml MEM/1 % FKS in einer Petriperm-Schale dazugegeben. Der Inhalt der Schalen wurde durch sanftes Hin- und Herschwenken durchmischt, um Follikel und Biomatrix möglichst gleichmäßig über den Boden der Schalen zu verteilen.

Diese Follikel mit Biomatrix wurden dann ebenfalls etwa 20 Stunden im Brutschrank unter den Standardbedingungen (siehe 2.4.1.) inkubiert.

2.5. Vitalitätsprüfung

2.5.1. Trypanblau

Der sogenannte Dye Exclusion Test mit dem Farbstoff Trypanblau ist ein vielfach verwendeter Test zur Vitalitätsprüfung von Zellen in Kultur (45). Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während sich bei toten oder geschädigten Zellen sowohl das Zytoplasma, als auch der Zellkern anfärben.

Wir verwendeten eine 0,5 %ige Trypanblau-Lösung in 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung (Firma Boehringer Mannheim). Da die Trypanblau-Endkonzentration 0,18 % betragen soll (32), wurde die Lösung in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} vorverdünnt. Im Endansatz wurde ein Tropfen Follikelsuspension mit einem Tropfen vorverdünnter Trypanblau-Lösung auf einem Objektträger vermischt. Diese Suspension wurde drei bis vier Minuten lang stehengelassen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und im Lichtmikroskop betrachtet. Die toten und lebenden Zellen wurden in einzelnen Follikeln oder in einem Gesichtsfeld übersichtsweise ausgezählt und der Prozentsatz an toten Zellen errechnet.

2.5.2. Acridin-Orange / Ethidium-Bromid

Der zweite, von uns angewandte Test zur Vitalitätsprüfung der Follikel beruht auf der unterschiedlichen Fluoreszenz lebender und toter Zellen, die sich mit verschiedenen fluoreszierenden Stoffen anfärben.

Lebende Zellen nehmen Acridin-Orange auf und zeigen Grünfluoreszenz (39). Ethidium-Bromid dringt in tote Zellen ein und fluoresziert rot (7).

Für diesen Test wird eine Acridin-Orange-Stocklösung, 1 mg Acridin-Orange gelöst in 100 ml PBS, und eine Ethidium-Bromid-Stocklösung, 20 mg Ethidium-Bromid gelöst in 100 ml PBS, hergestellt. Beide Lösungen können in dunklen Flaschen bei 4°C aufbewahrt werden. Vor dem Test werden jeweils 100 µl Acridin-Orange- und 100 µl Ethidium-Bromid-Stocklösung frisch gemischt und 1:10 in Medium (MEM) weiterverdünnt. Je 50 µl von dieser Gebrauchslösung und von der Follikelsuspension werden zusammen auf einen Objektträger pipettiert, vermischt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und im Fluoreszenzmikroskop (Nikon Kogaku K.K., Diaphot-T MD, inverted microscope) betrachtet. Dabei sieht man die fluoreszierenden Follikel räumlicher, als die Follikel im Trypanblau-Test. Die toten, orangerot-fluoreszierenden Zellen heben sich deutlich von den lebenden, grünfluoreszierenden Zellen ab. Das Problem der genauen Zellauszählung blieb unverändert bestehen, da wir stets nur die eine, sichtbare Seite einzelner, ganzer Follikel beurteilen konnten.

2.6. Morphologische Techniken

2.6.1. Fixierung der Follikel

Etwa 0,25 ml in Medium suspendierte Follikel werden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Follikelsuspension wird kurz in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben. Das Pellet aus Follikeln wird einmal mit 1 ml 6,25 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) gewaschen, danach noch ein

zweitesmal in 1 ml derselben Lösung suspendiert und darin für ein bis zwei Stunden im Kühlschrank fixiert. Anschließend wird die Glutaraldehyd-Lösung wieder abzentrifugiert. Die Follikel werden zweimal mit je 1 ml 0,2 M kalter Saccharose-Lösung gewaschen und können in dieser Lösung bei 4°C gelagert werden.

2.6.2. Histologische Technik

Die histologischen Schnitte wurden von Herrn Dr med. W. Permanetter (Pathologisches Institut, München) angefertigt, bei dem ich mich an dieser Stelle herzlich bedanke.

Die vorfixierten, mit Saccharose-Lösung gewaschenen Follikel wurden mit 2 % Osmiumsäure (OsO_4) nachfixiert und in Epon eingebettet. Die 1- 2 μm dicken Schnitte wurden mit einem Reichart Ultramicrotom angefertigt und mit Azur-II-Methylenblau angefärbt.

2.7. Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der Bildung von cyclischem Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP)

2.7.1. Herstellung der Testlösungen

Von bovinem TSH wurden Stocklösungen mit Konzentrationen von 2 U/ml und 100 mU/ml hergestellt. Dazu wurde jeweils eine Ampulle bTSH (10 U) in 5 ml sterilem Minimal Essential Medium (MEM) gelöst und à 500 μl in sterilen, silikonisierten Eppendorf-Gefäßen portioniert. Ein Teil dieser Stocklösung mit 2 U/ml bTSH wurde sofort mit

sterilem MEM 1:20 (50 µl 2 U/ml bTSH + 950 µl MEM) weiter vorverdünnt auf eine Konzentration von 100 mU/ml bTSH. Diese Stocklösungen wurden bei -20°C eingefroren und erst kurz vor den Versuchen aufgetaut und mit MEM auf die benötigte Konzentration verdünnt. Die höchste verwendete TSH-Endkonzentration lag bei 100 mU/ml bTSH, die niedrigste bei 0,1 µU/ml bTSH.

Im Gegensatz zum bTSH wurden Isoproterenol, Adrenalin, Noradrenalin und Propranolol, die bei 4°C als Trockensubstanzen aufbewahrt wurden, und Acetylcholin und 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX), die bei -20°C als Trockensubstanzen eingefroren waren, vor jedem Versuch frisch abgewogen, gelöst und verdünnt.

Von Isoproterenol, Adrenalin, Noradrenalin und Acetylcholin wurden dazu erst Stocklösungen von 10 mM in 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt:

Isoproterenol 10 mM: 2,657 mg in 1 ml 0,9 % NaCl;
Adrenalin 10 mM: 3,513 mg in 1 ml 0,9 % NaCl;
Noradrenalin 10 mM: 3,463 mg in 1 ml 0,9 % NaCl;
Acetylcholin 10 mM: 18,2 mg in 10 ml 0,9 % NaCl.

Auch alle Vorverdünnungen dieser Substanzen wurden mit 0,9 % NaCl angesetzt. Erst die letzte Verdünnungsstufe wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn mit MEM hergestellt. Isoproterenol wurde in Endkonzentrationen von 0,1 µM bis 100 µM eingesetzt, Adrenalin und Noradrenalin in einer Endkonzentration von 1 µM und Acetylcholin von 10 µM.

Propranolol und IBMX konnten sofort in MEM gelöst und darin weiterverdünnt werden. Für die Stocklösung von Propranolol 10 mM wurden 3,138 mg in 1 ml MEM gelöst. Es wurde in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt. Bei der Herstellung der IBMX-Stocklösung von 5 mM mußten 11,12 mg IBMX ca. zwei bis drei Stunden in 10 ml vorge-

wärmtem MEM auf einem Magnetrührer gerührt werden, bis es sich vollständig gelöst hatte. Die verwendeten Endkonzentrationen betrugen 0,5 und 1 mM IBMX.

Alle Gefäße für die Herstellung und Aufbewahrung der Testlösungen waren silikonisiert.

2.7.2. Inkubationsbedingungen

Kurzzeitinkubationen bis zu einer Stunde wurden mit Follikeln in silikonisierten 2 ml Eppendorf-Gefäßen im Wasserbad bei 37°C ausgeführt, länger dauernde Inkubationen dagegen in sterilen, kleinen Petrischalen (Tissue Culture Petri Plate) im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luft-, 5 % CO₂-Begasung. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Follikel in Minimal Essential Medium (MEM) mit einem Zusatz von 1 % fötalem Kalbsserum inkubiert. Zur Hemmung der Phosphodiesterasen wurde bei einem Teil der Versuche 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) in einer Konzentration von 0,5 beziehungsweise 1 mM im Medium eingesetzt.

Nach einer Ruhephase von 18 bis 20 Stunden im Brutschrank wurden die Follikel unter sterilen Bedingungen unter dem Laminar-Air-Flow aus den Petriperm-Schalen in ein großes Reagenzglas (ca. 80 ml) überpipettiert und darin zweimal mit je 20 - 30 ml sterilem MEM gewaschen, um Stoffwechselprodukte und Einzelzellen zu entfernen. Danach wurden die Follikel in sterilem MEM mit einem Zusatz von 1 % FKS suspendiert, fortwährend gleichmäßig mit der Pasteurpipette durchmischt und mit einer Pipette à 450 µl auf die silikonisierten 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt.

Das Standardvolumen in den kleinen Petrischalen bei den Inkubationen für mehr als eine Stunde im Brutschrank betrug 750 µl Follikelsuspension pro Schale. Bei diesen

Langzeitinkubationen wurden die Follikel nach dem Waschen in MEM mit 1 % FKS und 1 mM IBMX aufgenommen.

Für durchschnittlich vier Einzelwerte wurde eine Petriperm-Schale mit Follikeln, also etwa 0,1 ml sedimentierte Follikel verbraucht. Die DNA-Menge in einem Eppendorf-Gefäß lag meist zwischen 15 µg und 35µg.

Die Follikel wurden nach dem Waschen und Verteilen ca. 15 Minuten lang in den Eppendorf-Gefäßen im Brutschrank inkubiert. Erst unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden alle Eppendorf-Gefäße für einen Versuch aus dem Brutschrank genommen und mit Deckeln verschlossen. Sie blieben bis zu ihrem jeweiligen Versuchszeitpunkt bei Raumtemperatur stehen.

Kinetische Untersuchungen wurden nach einem exakten Zeitplan durchgeführt. Die Zahl der Einzelwerte bei einem Versuchsdurchgang war durch den standardisierten zeitlichen Ablauf für die Einzelprobe (siehe Abb. 3) auf ca. 30 bis maximal 40 limitiert.

Als erstes wurde jedes Gefäß zwei Minuten bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Rezeptorenblocker oder IBMX wurden vorher in 50- oder 10facher Konzentration zugegeben, entsprechend einem Volumen von 10 beziehungsweise 50 µl.

Nach dieser Vorinkubation wurden bTSH, Isoproterenol, MEM (Kontrolle) beziehungsweise die jeweilige Test-Substanz in 50- oder 10facher Konzentration zugegeben, wiederum einem Volumen von 10 beziehungsweise 50 µl entsprechend. Das Gefäß wurde einmal von Hand geschüttelt und für die Dauer der Versuchszeit (30 Sekunden bis zu 1 Stunde) zurück ins Wasserbad gestellt.

Bei Inkubationszeiten über 10 Minuten wurden die Eppendorf-Gefäße ca. alle 10 Minuten einmal von Hand geschüttelt, um die Follikel, die sich in der Spitze der Gefäße abgesetzt hatten, aufzuwirbeln.

Versuchsablauf für eine Einzelprobe

1. Fakultative Zugabe von Rezeptorenblocker oder IBMX
 2. Vorinkubation: 2 Minuten bei 37°C im Wasserbad
 3. Zugabe der Testsubstanz (z.B. bTSH),
Schütteln der Probe
 4. Inkubation für die Dauer der Versuchszeit
(30 Sekunden bis zu einer Stunde)
 5. Stoppvorgang (Gesamtdauer eine Minute):
15 Sekunden Zentrifugation
15 Sekunden Auslaufzeit
30 Sekunden Trennung der Probe in

Überstand

(ca. 490 -
500 µl)

und

Follikel-
pellet +

500 µl
6 %ige TCA
 6. Überstand und Follikelpellet in Trichloressigsäure
(TCA) auf Eis gestellt
-

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für eine Einzelprobe, ein Eppendorf-Gefäß mit 450 µl Follikelsuspension, bei den Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der Bildung von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP).

Das Endvolumen in einem Eppendorf-Gefäß, nach Zugabe aller Testsubstanzen, betrug stets 500 beziehungsweise 510 µl.

Die Reaktion in jedem einzelnen Eppendorf-Gefäß wurde durch Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge gestoppt (15 s, 10 000 g; 15 s Auslaufzeit). Danach wurde der Überstand möglichst vollständig, aber ohne Follikel mitzunehmen, abgehoben und in ein getrenntes Eppendorf-Gefäß überpipettiert. Das Pellet aus Follikeln wurde sofort mit 500 µl kalter, 6 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt.

Der gesamte Stoppvorgang bei einer Einzelprobe dauerte nicht länger als eine Minute. Sowohl die Eppendorf-Gefäße mit den Überständen, als auch die Follikelpellets in TCA wurden auf 4°C gekühlt bis zur weiteren Verarbeitung.

Bei Reaktionszeiten über eine Stunde mußten anstelle der Eppendorf-Gefäße mit je 450 µl Follikelsuspension die sterilen, kleinen Petrischalen mit dem größeren Ausgangsvolumen von 750 µl Follikelsuspension verwendet werden. Dem entsprechend wurden je 80 µl Testlösung hinzupipettiert, durch Hin- und Herschwenken mit der Follikelsuspension vermischt und die Schalen für die Dauer der Versuchszeit in den Brutschrank (37°C; 95 % Luft-, 5 % CO₂-Begasung) gestellt.

Durch die Verwendung der kleinen Petrischalen mit dem großen Volumen an Follikelsuspension und durch die Inkubation im Brutschrank wurde bei den langen Versuchszeiten über eine Stunde die Stabilität des Milieus, speziell des pH-Werts, in den Einzelproben gewährleistet.

Die Reaktion wurde auch hier beendet, indem die Follikelsuspension in silikonisierte Eppendorf-Gefäße überpipettiert und scharf abzentrifugiert wurde (Eppendorf-Zentrifuge). Danach wurden Pellets und Überstände wieder voneinan-

der getrennt und die Follikelpellets mit je 500 µl kalter 6 %iger TCA versetzt.

Die Extraktion des cyclischen Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) aus den Follikelpellets mit der 6 %igen TCA schloß sich noch am selben Tag direkt an den Versuch an.

2.7.3. Radioimmunologische Bestimmung von cAMP

Die Bestimmung des cyclischen Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) mit einem Radioimmunoassay erfolgte in den Mediumproben direkt. Aus den Zellen mußte das cAMP dagegen erst für die Messung extrahiert werden.

Im Anschluß an den Versuch wurden die Follikelpellets in der 6 %igen TCA durch wiederholtes Durchziehen mit einer Pipette resuspendiert und die Zellen aufgebrochen. Danach mußten die Proben mindestens 30 Minuten bei 4°C stehen, bis das cAMP sich in der TCA gelöst hatte. Die Proben wurden dann in der Eppendorf-Zentrifuge scharf abzentrifugiert und die 500 µl Überstand möglichst vollständig, aber ohne Zellen mitzunehmen, in Glasröhrchen überführt. Aus dem verbleibenden Follikelpellet in den Eppendorf-Gefäßen wurde die DNA-Menge bestimmt (siehe 2.7.4.). Die Glasröhrchen mit dem im Überstand (6 %ige TCA) gelösten cAMP konnten, mit Stöpseln verschlossen, bis zum nächsten Tag bei 4°C aufbewahrt werden.

Der nächste Schritt war die Entfernung der Säure aus den Proben durch eine Äther-Extraktion. In jedes Röhrchen wurden mit einer Dispensette 5 ml H₂O-gesättigter Diäthyläther gegeben. Die Proben wurden auf dem Vortex geschüttelt und der Äther (obere Phase) wurde unter Sicht bis auf einen kleinen Rest abgesaugt. Diese Extraktion wurde

insgesamt dreimal mit jeweils 5 ml Äther durchgeführt. Nach der dritten Äther-Extraktion wurde die verbleibende wässrige Phase im Wasserbad bei 65°C unter N₂-Begasung und ständigem Schütteln eingetrocknet (Dauer ca. 20 bis 30 Minuten). Der Stickstoff wurde in jedes Probenröhrchen gesondert eingeleitet. Die eingetrockneten Proben in den Glasröhrchen konnten bei -20°C aufbewahrt, oder aber sofort in je 500 µl kaltem Aqua dest. gelöst werden, um ein standardisiertes Ausgangsvolumen für die Messung des cAMP herzustellen.

Wir verwendeten einen cAMP-Radioimmunoassay-Kit von Becton & Dickinson. Es wurden je 100 µl der in Aqua dest. gelösten Probe beziehungsweise des Mediums nach der Vorschrift des Herstellers eingesetzt und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben beziehungsweise Standards wurden stets als Doppelwerte gemessen. Die Auswertung erfolgte über "Spline-Approximation" (36).

2.7.4. Photometrische DNA-Bestimmung

Aus den Follikelpellets in den Eppendorf-Gefäßen wurde nach der Extraktion des cAMP die DNA-Menge bestimmt. Als erstes mußten die Trichloressigsäure-Reste in den Pellets abgepuffert werden, damit eine enzymatische Verdauung der Follikel durchgeführt werden konnte. Dazu wurde jedes Pellet mit 500 µl 0,1 M Tris-Puffer (pH 8,6) gewaschen. Die Proben wurden zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge) und die 500 µl Trispuffer wieder abpipettiert und verworfen. In jedes Eppendorf-Gefäß wurden 350 µl Tris-EDTA-NaCl-Puffer (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; pH 7,0), 50 µl 1 % SDS und 100 µl Proteinase K (2 mg/ml) pipettiert und das Pellet darin durch Pipettieren suspendiert. Die Proben blieben zur enzymatischen Verdauung der Proteine über Nacht bei 30°C im Wasserbad stehen.

Für die DNA-Bestimmung mußten die Proben vollständig klar, ohne Gewebeflocken und gut durchmischt sein.

Die nachfolgend kurz beschriebene DNA-Messung wurde photometrisch nach der Methode von K. BURTON durchgeführt (4).

Bei der Reaktion wird ein Diphenylamin-Reagenz eingesetzt, 1,5 g Diphenylamin gelöst in 100 ml Eisessig mit einem Zusatz von 1,5 ml konzentrierter Schwefelsäure. Zu je 30 ml dieser Lösung werden 0,2 ml einer wässrigen Acetaldehyd-Lösung, 20 µl Acetaldehyd vermischt mit 1 ml Aqua dest., zugesetzt. Die wässrige Acetaldehyd-Lösung muß dabei immer frisch hergestellt werden und darf erst kurz vor Verwendung des Diphenylamin-Reagenz zupipettiert und damit vermischt werden.

Als Standard wurde Kalbsthymus-DNA, verdünnt in Tris-EDTA-NaCl-Puffer, verwendet (Verdünnungsstufen: 0; 6,25; 12,5;

25; 50; 100; 200 µg DNA/ml). Es wurden stets Doppelwerte angesetzt. Je 200 µl Standard beziehungsweise Probe zusammen mit je 200 µl 1N HClO₄ wurden in Schliffgläser pipettiert. Die Gläser wurden mit den Glasstopfen verschlossen, geschüttelt und 15 Minuten bei 70°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde in jedes Röhrchen 800 µl des frisch angesetzten Diphenylamin-Reagenz pipettiert, der Glasstopfen wiederaufgesetzt und die Probe sorgfältig auf dem Vortex geschüttelt, bis alle Kondenswasser-Niederschläge an den Glaswänden untergemischt waren.

Die Proben wurden in den Schliffgläsern über Nacht bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Die Reaktion von Diphenylamin mit der DNA führt zur Bildung eines blauvioletten, klaren Farbstoffes in den Proben.

Zur Messung der Proben wurde ein Zeiss-Photometer benützt. Die Extinktion jeder Probe wurde bei 600 nm in einer Quarzküvette gegen den Null-Wert (Tris-EDTA-NaCl-Puffer) als ΔE bestimmt. Die DNA-Mengen wurden anhand der Eichkurve graphisch ermittelt und der Mittelwert der Doppel-Bestimmungen errechnet.

2.8. Aufnahme und Organifizierung von Jodid

2.8.1. Aufnahme von ^{125}J

Die Aufnahme von ^{125}J in die Follikel wurde sowohl anhand der Abnahme der Radioaktivität im Medium, als auch durch die direkte Bestimmung der Radioaktivität in den Zellen verfolgt.

2.8.1.1. Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Jodid

Follikel wurden nach ca. 20 Stunden Ruhephase im Brutschrank zweimal steril mit MEM gewaschen und in zwei Portionen aufgeteilt. Der eine Teil wurde in Medium mit einem Zusatz von 1 % FKS, der andere in Medium ohne FKS aufgenommen und in Petriperm-Schalen à 3,8 ml Follikelsuspension verteilt. Zu jeder Schale wurden 200 µl einer Mischung aus ^{125}J und ^{127}J in MEM hinzupipettiert, sodaß in jeder Schale ca. 300 000 cpm und eine Konzentration von 0,1 µM KJ waren. Nach 1, 2, 3, 4 und nach 23 Stunden wurden je 100 µl Medium aus den Schalen entnommen, ohne Follikel mitzunehmen, und in Eppendorf-Gefäßen im Gamma-Counter gezählt.

An der Abnahme der Zählrate in den Mediumproben ließ sich die Dauer der Aufnahme des Jodids in die Follikel verfolgen. Dabei wurden die Follikel in Medium mit 1 % FKS mit denen in Medium ohne FKS verglichen.

2.8.1.2. Aufnahme von Jodid unter Zugabe von TSH und Isoproterenol

Für die zweite Versuchsanordnung wurden die Follikel ebenfalls nach einer ca. 20stündigen Ruhephase im Brutschrank zweimal steril mit MEM gewaschen. Danach wurden sie in MEM mit einem Zusatz von 1 % FKS aufgenommen und à 400 µl auf Eppendorf-Gefäße verteilt. Zu jedem Gefäß wurden 50 µl ^{125}J (ca. 150 000 cpm) und bei einem Teil der Versuche zusätzlich 10 µl 5 µM ^{127}J (Endkonzentration in den Gefäßen 0.1 µM KJ) hinzupipettiert. Der Versuch wurde mit der Zugabe von 50 µl TSH beziehungsweise Isoproterenol in 10facher Konzentration beziehungsweise 50 µl Medium (Kontroll-Wert) gestartet. Alle Eppendorf-Gefäße wurden von Hand geschüttelt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt und die Proben sofort in einer Eppendorf-Zentrifuge eine Minute lang zentrifugiert. Der erste Überstand wurde in separate Eppendorf-Gefäße überpipettiert. Das Follikelpellet wurde mit 500 µl kaltem MEM gewaschen und zentrifugiert. Auch dieser zweite Wasch-Überstand wurde in eigene Eppendorf-Gefäße pipettiert (Abb. 4).

Alle drei Fraktionen, Follikelpellet, erster und zweiter Überstand, wurden im Gamma-Counter (Nuclear Enterprises NE 1600) gezählt. Die prozentuale Gesamtaufnahme von Jodid in die Follikel errechnete sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{\text{cpm Follikelpellet}}{\text{cpm Follikelpellet} + \text{cpm 1. Überstand} + \text{cpm 2. Überstand}} \times 100 \%$$

Nach der Bestimmung der DNA-Mengen der Einzelwerte konnte in den Versuchen mit Zugabe von ^{127}J (0.1 µM KJ), zusätzlich zum ^{125}J , die Aufnahme von Jodid in die Follikel als pMol aufgenommenes KJ pro µg DNA errechnet werden.

Bestimmung der Aufnahme und Organifizierung von Jodid
in isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität

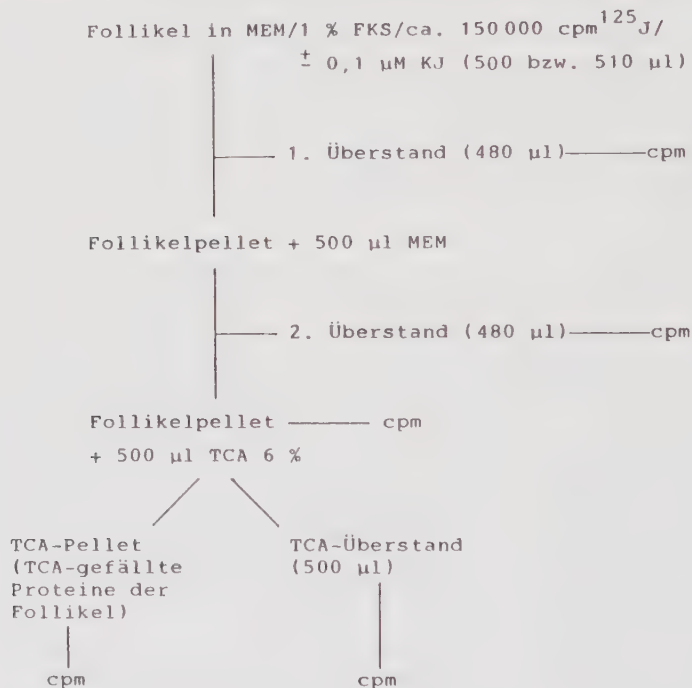


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsan-
satzes zur Bestimmung der Aufnahme und
Organifizierung von Jodid in isolierten
Follikeln mit erhaltener Polarität.

FKS	fötales Kalbsserum
MEM	minimal essential medium
TCA	Trichloressigsäure
—cpm	Zählung im Gamma Counter (counts per minute)

2.8.2. Bestimmung des organifizierten Jods durch Trichlor- essigsäure-Fällung

Das in Proteine beziehungsweise Schilddrüsenhormone eingebaute, sogenannte organifizierte Jod wurde durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) bestimmt.

Die Follikelpellets in den Eppendorf-Gefäßen wurden nach Abtrennung des zweiten Wasch-Überstandes und Zählen im Gamma-Counter mit je 500 µl 6 %iger TCA versetzt (Abb. 4).

Follikel und TCA wurden mit Pipetten durchmischt, über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert und danach in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Überstände und Pellets wurden getrennt im Gamma-Counter gezählt. Das in TCA-fällbare Proteine eingebaute Jodid wurde in Prozent des in die Follikel aufgenommenen Jodids nach der folgenden Formel errechnet:

$$\frac{\text{cpm TCA-gefällte Proteine der Follikel (TCA-Pellet)}}{\text{cpm TCA-Pellet} + \text{cpm TCA-Überstand}} \times 100 \%$$

2.9. Freisetzung von Schilddrüsenhormon

2.9.1. Inkubationsbedingungen für die Follikel mit erhaltener Polarität

Isolierte Follikel wurden nach einer ca. 20stündigen Ruhephase im Brutschrank zweimal mit MEM unter sterilen Bedingungen gewaschen, um Stoffwechselprodukte und Einzelzellen zu entfernen. Danach wurden sie erneut in MEM mit einem Zusatz von 1 % FKS aufgenommen, gleichmäßig darin

durchmischt und auf drei Petriperm-Schalen zurückverteilt, davon zwei Schalen mit je 4,0 ml und eine mit 4,2 ml Follikelsuspension (pro Schale ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen). Zu einer der Schalen mit 4,0 ml Follikelsuspension wurden 40 μ l MEM mit 100 mU/ml TSH hinzupipettiert (Endkonzentration etwa 1 mU/ml TSH), zu der anderen 80 μ l MEM mit 5 U/ml TSH (Endkonzentration etwa 100 mU/ml TSH). Die Schale mit 4,2 ml Follikelsuspension wurde als Kontrolle ohne TSH eingesetzt.

Sofort nach Zugabe des TSH, also zum Zeitpunkt Null, und nach 14 h, 20 h und 24 h Inkubation im Brutschrank wurden jeweils 400 μ l Follikelsuspension aus jeder Schale entnommen. Die Proben wurden in Eppendorf-Gefäße pipettiert, in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und die Überstände für die T_4 -Bestimmung von den Follikeln getrennt.

2.9.2. Inkubationsbedingungen für die Follikel mit umgekehrter Polarität

Auch die Follikel mit umgekehrter Polarität, die 24 Stunden in MEM mit 10 % FKS im Brutschrank kultiviert worden waren, wurden zweimal mit MEM unter sterilen Bedingungen gewaschen. Danach wurden etwa zwei Drittel der Follikel in MEM mit einem Zusatz von 0,18 % Human-Albumin aufgenommen und auf zwei Petriperm-Schalen zurückverteilt, davon eine Schale mit 4,0 ml und eine mit 4,2 ml Follikelsuspension. Das restliche Drittel an Follikeln mit umgekehrter Polarität wurde in 4,0 ml MEM mit 0,18 % Human-Albumin und zusätzlich 20 mg Thyreoglobulin suspendiert (Endkonzentration etwa 5 mg Tg/ml) und ebenfalls in eine Petriperm-Schale pipettiert. Das Thyreoglobulin wurde aus Schweineschilddrüsen nach der Methode von LEJEUNE et al. isoliert (33).

Zu den beiden Schalen mit 4,0 ml Follikelsuspension mit und ohne Thyreoglobulin wurden je 200 μ l MEM mit 2 U/ml TSH hinzupipettiert (Endkonzentration etwa 100 mU/ml TSH). Die Schale mit 4,2 ml Follikelsuspension diente als Kontrolle. Sofort nach Zugabe des bTSH, also zum Zeitpunkt Null, und nach 2 h, 4 h, 6 h, 15 h und 24 h Inkubation im Brutschrank wurden jeweils 400 μ l Follikelsuspension aus jeder Schale entnommen. Die Proben wurden in Eppendorf-Gefäße pipettiert, in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und die Überstände wieder für die T_4 -Bestimmung von den Follikeln getrennt.

2.9.3. Extraktion von T_4 aus den Proben mit Thyreoglobulin

Da Schweine-Thyreoglobulin mit dem T_4 -Antikörper im T_4 -Radioimmunoassay (siehe 2.9.4.) kreuzreagiert, mußte bei dem Versuchsansatz mit den Follikeln mit umgekehrter Polarität T_4 von Thyreoglobulin abgetrennt werden, bevor es mit dem RIA gemessen werden konnte.

Die nachfolgend kurz beschriebene Methode der Abtrennung von T_4 über Sephadex G-25 superfine Säulen findet sich ausführlich beschrieben bei K. HORN (28).

25 Zylinder von 2 ml Einmalspritzen mit einem feinporigen Filterpapier als "Fritte" vor dem Auslauf, wurden mit einer Suspension von Sephadex G-25 superfine gefüllt, das über Nacht in Aqua bidest. gequollen war. Die Säulen wurden mit 0,05 M Phosphat in 0,15 M NaCl (pH 7,4) gespült und anschließend mit 0,05 N NaOH in 0,15 M NaCl alkalisiert. Mit einer 25-Kanal-Schlauchpumpe (25-canal-micro-pump, Fa. Ismatec, Zürich/Schweiz) wurden je 100 μ l Standard beziehungsweise Probe zusammen mit 100 μ l 0,05 N NaOH in 0,15 M NaCl/0,1 g% BSA (bovines Serum-Albumin) quantita-

tiv aufgetragen und dann mit 0,05 N NaOH in 0,15 M NaCl/0,1 g% BSA eluiert (ca. 360 μ l Eluat pro Minute). Das Thyreoglobulin-haltige Eluat der ersten 13 Minuten wurde verworfen und danach der T_4 -Peak in 27 Minuten quantitativ (ca. 9,7 ml) in Reagenzröhrchen gesammelt. Abschließend wurden die Säulen wieder mit 0,05 Phosphat in 0,15 M NaCl auf pH 7,4 umgepuffert.

Der Ansatz für den T_4 -RIA wurde entsprechend dem größeren Volumen, in dem das T_4 nun gelöst war, verändert: zu je 2 ml Probe beziehungsweise gleich behandeltem Standard wurden 250 μ l 1,5 M Tris-HCl-Lösung (pH 1,0), 100 μ l T_4 -Tracer und 50 μ l der Mischung aus erstem und zweitem Antikörper (siehe 2.9.4) hinzupipettiert.

Nach der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz wie unter 2.9.4 beschrieben weiterbehandelt.

2.9.4. T_4 -Bestimmung mit Radioimmunoassay

Das von den Follikeln freigesetzte T_4 wurde direkt in den Überständen mit einem T_4 -Radioimmunoassay gemessen (19).

Das Prinzip dieses T_4 -RIA beruht darauf, daß ein T_4 -Antikörper verwendet wird, dessen Bindungsoptimum bei pH 3,8 liegt. T_4 -bindende Proteine, wie zum Beispiel Albumin, binden in diesem Bereich nicht, sodaß es keine Protein-Interferenzen gibt.

Es wurde eine besonders empfindliche Eichkurve in 0,9 % NaCl mit 0,1 g% bovinem Serum-Albumin eingesetzt (Standards: 0; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 μ g % T_4). Der T_4 -Tracer wurde auf ca. 20000 cpm/100 μ l verdünnt mit einer Lösung aus 0,1 n HCl mit 20 % Propylenglykol.

Für den Ansatz wird eine 0,1 M Dinatriumcitrat-Lösung gebraucht (19,2 g Kristallwasserfreie Citronensäure gelöst in 200 ml 1 N Natronlauge, mit 0,2 g Natriumazid versetzt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt) und eine Mischung aus erstem und zweitem Antikörper (1. Antikörper 1:150 und 2. Antikörper 1:30 vorverdünnt in 0,9 % NaCl mit 0,02 g% Natriumazid und im Verhältnis 1:1 mindestens eine Stunde vor Gebrauch bei Raumtemperatur vermischt; Haltbarkeit ca. zwei Wochen bei 4°C).

Der nachfolgend kurz dargestellte Ansatz des T_4 -Radioimmunoassay findet sich ausführlich beschrieben bei GÄRTNER et al. (19).

Je 20 μ l Probe (Überstand) beziehungsweise Standard werden mit 120 μ l T_4 -Tracer mit einem Pipettiergerät (Firma LKB) in Eppendorf-Gefäße pipettiert und je 100 μ l 0,1 M Dinatriumcitrat-Lösung mit einer Hamiltonspritze zugegeben. Erst danach werden ebenfalls mit einer Hamiltonspritze je 100 μ l der Mischung aus erstem und zweitem Antikörper zugesetzt. Für die unspezifische Bindung wird der erste Antikörper durch 7 μ g % Kaninchen-Gammaglobulin gelöst in 0,9 % NaCl mit 0,02 % Natrium-Azid ersetzt.

Nach der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur werden je 1,0 ml 0,9 % NaCl-Lösung mit einem Zusatz von 0,02 g% Natrium-Azid aus einer Dispensette zugegeben, bei 4000 Upm 15 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand mit einem Abstandshalter an einer Wasserstrahlpumpe in eine zwischengeschaltete Flasche abgesaugt. Der Niederschlag wird nochmals nach dem gleichen Vorgehen mit 1,0 ml der 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Absaugen des zweiten Wasch-Überstands werden die Niederschläge in den Eppendorf-Gefäßen in Zählständern im Gamma-Counter gezählt (Zählzeit eine Minute).

Es wurden stets Doppelwerte von allen Proben und Standards gemessen. Die Auswertung erfolgte über "Spline-Approximation" (36). Aus den T_4 -Konzentrationen in den Medium-Proben wurden dann die Mengen an freigesetztem T_4 für das Gesamtvolumen in den Schalen errechnet. Die T_4 -Menge jeder Schale zum Zeitpunkt Null wurde von allen weiteren Werten dieser Schale abgezogen. So konnte die T_4 -Freisetzung der Follikel ins Medium als $\Delta \text{ ng } T_4$ pro Schale über die Zeit aufgezeichnet werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Morphologie isolierter Follikel mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-Follikel)

Die von uns entwickelte und standardisierte Methode zur Präparation isolierter Follikel aus Schweineschilddrüsen lieferte eine Suspension von Follikeln (Abb. 5 A). Zwischen den größtenteils geschlossenen, intakten Follikeln zeigten sich nach den Wasch- und Sedimentationsschritten nur noch wenige aufgerissene Follikel, Follikelsegmente und Einzelzellen. Der mittlere Durchmesser der Follikel lag zwischen 100 und 200 μm .

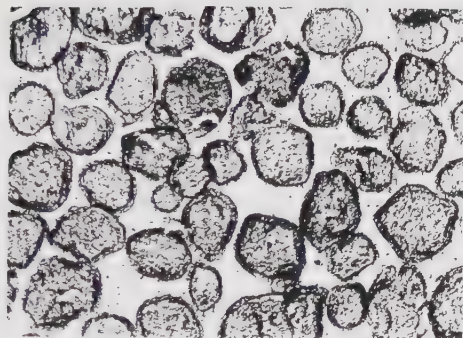
Die Betrachtung von Schnitten durch isolierte Schweineschilddrüsenfollikel unter dem Lichtmikroskop bei 640- und 1000-facher Vergrößerung zeigte, daß ihre Polarität erhalten war. Die Kerne lagen nahe der basolateralen Membran der Schilddrüsenzellen. Mikrovilli fanden sich nur an der apikalen Zellmembran, zum Lumen hin, und nicht an der basalen, dem Medium zugewandten Membran (Abb. 5 B und C). An der basalen Membran waren dagegen Reste von Bindegewebe zu erkennen, wahrscheinlich unvollständig abgebaute Kollagenfasern.

Die Auszählung histologischer Schnitte von Follikeln sowohl unmittelbar nach der Präparation, als auch nach ca. 20 Stunden Inkubation in MEM mit 1 % FKS ergab etwa 70 % geschlossene Follikel. Es wurden nur lückenlos geschlossene Follikel berücksichtigt, obwohl sicher ein Teil der primär intakten Follikel erst während der Fixierung und Anfertigung der histologischen Schnitte aufgebrochen worden war. Der Anteil an geschlossenen Follikeln mit umgekehrter Polarität lag unter 15 %. Erfolgte die Fixierung der Follikel sofort nach der Präparation,

Abbildung 5: Morphologie isolierter Follikel mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-Follikel)

- A) Überwiegend intakte Schweineschilddrüsenfollikel in Suspension unmittelbar nach der Präparation (x 100).
- B) Schnitt durch einen isolierten Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität nach einem Tag in Kultur. Die Zellkerne liegen in der Nähe der basalen Membran zum Medium hin orientiert. Das Lumen, das von der apikalen Membran umschlossen wird, ist mit Kolloid gefüllt (x 640).
- C) Bei stärkerer Vergrößerung werden die Mikrovilli an der apikalen Membran, zum Lumen hin gerichtet erkennbar (x 1000).

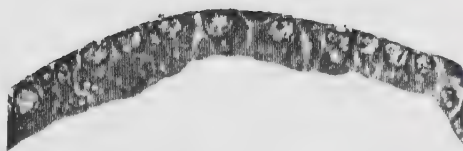
A



B



C



enthielten nur ca. 20 % der geschlossenen Follikel ange-färbtes Kolloid, nach 20 h Inkubation in MEM 1 % FKS waren es bereits ca. 50 %, als Zeichen der Neusynthese von Thyreoglobulin.

Auch bei den nativ im Lichtmikroskop betrachteten Follikeln in Suspension fiel nach der 20stündigen Inkubation bereits vielfach eine bessere Abrundung und beginnende Aufblähung der Follikel durch die Anfüllung mit Kolloid auf.

Die Follikel waren zu diesem Zeitpunkt mehr in Aggregaten zusammengelagert als unmittelbar nach der Präparation.

Die polare Struktur der isolierten Follikel wurde auch im Vergleich nach einem beziehungsweise sechs Tagen in Kultur im Brutschrank in Medium mit der Standardkonzentration von 1 % FKS und in Medium mit einer hohen Konzentration von 5 % FKS untersucht.

Die Follikel waren nach den sechs Tagen in Kultur vermehrt aggregiert. In den Aggregaten waren neben Follikeln mit vollständig erhaltener Polarität auch sogenannte Bilayer zu sehen. Dabei war an einigen Follikeln mit erhaltener Polarität außen eine zweite Zellschicht mit umgekehrter Polarität angelagert. Diese äußere Zellage war jedoch meist nicht vollkommen geschlossen.

Bei der Auszählung der histologischen Schnitte wurde wieder die Lage der Zellkerne in den Thyreozyten zur Beurteilung der Polarität benutzt. Das strenge Kriterium der vollständigen, lückenlosen Geschlossenheit der angeschnittenen Follikel wurde dagegen nicht mehr zusätzlich angewandt (siehe oben), da es sich bei kleineren Lücken in der Zellreihe auch um Artefakte der histologischen Technik handeln kann. Allerdings wurden große Follikel-segmente und Follikel mit unklarer und wechselnder Lage der Zellkerne wieder als nicht beurteilbar eingestuft.

Es gab demnach jeweils drei Gruppen:

Follikel mit erhaltener Polarität ("right-side-right"-
Follikel = RSR-Follikel);

Follikel mit umgekehrter Polarität ("inside-out"-Follikel = ISO-Follikel)

und

die unklaren Fälle.

Nach einem Tag in Kultur in Medium mit 1 % FKS lagen ca. 78 % RSR-Follikel vor, ca. 12 % ISO-Follikel und ca. 10 % nicht eindeutig beurteilbare Follikel.

Nach sechs Tagen in Kultur in Medium mit 1 % FKS wurden ca. 85 % RSR-Follikel gezählt, ca. 9 % ISO-Follikel und ca. 6 % unklare Fälle.

Bei den Follikeln, die sechs Tage lang in Medium mit 5 % FKS kultiviert wurden, waren ca. 79 % RSR-Follikel, ca. 11 % ISO-Follikel und ca. 10 % nicht beurteilbare Follikel.

Zwischen den Follikeln, die sechs Tage in Medium mit 1 % beziehungsweise 5 % FKS inkubiert worden waren, konnten wir also keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Follikel mit erhaltener Polarität finden. Die polare Struktur der "right-side-right"-Follikel blieb während der sechstägigen Kulturzeit sowohl in Medium mit 1 %, als auch mit 5 % FKS stabil.

3.2. Einfluß der Biomatrix auf die Morphologie isolierter Follikel

Wie in den Vorversuchen gezeigt wurde (siehe 2.2.3), war die polare Struktur von Follikeln, die durch Zentrifugation und Filtration durch Nylonnetze von Bindegewebe gereinigt worden waren, sehr instabil. Die Ausbeute an Follikeln mit erhaltener Polarität war bei dieser Methode wesentlich geringer, als bei der Präparation isolierter Follikel durch Sedimentation und Herauslesen größerer Bindegewebsflocken und Aggregate von Hand. Daher wurde bei einem Teil der Vorversuche eine Bindegewebsbiomatrix eingesetzt mit dem Ziel der Stabilisierung der polaren Struktur frisch isolierter, filtrierter und zentrifugierter Follikel.

Die Biomatrix wurde in Anlehnung an die Methode von ROJKIND et al (47) aus Schweineschilddrüsen hergestellt und besteht, wie bereits beschrieben (siehe 2.4.3.1.), aus isolierten Bindegewebsfasern, Basalmembrankomponenten und Grundsubstanz. Bei der Inkubation mit der Biomatrix zeigte sich zwar tatsächlich nach 20 Stunden ein größerer Anteil an Follikeln mit erhaltener Polarität und beginnender Auffüllung der Lumina mit Kolloid, als bei der Inkubation der filtrierten und zentrifugierten Follikel allein in Medium mit 1 % FKS. Die Biomatrix hatte jedoch den erheblichen Nachteil, daß sich die Follikel, wie auch für Rattenleberzellen von ROJKIND et al. (47) beschrieben, an die Matrix anhängten und große Aggregate bildeten, in denen häufig auch mehr als zwei Zellreihen von Thyreozyten aneinanderlagen. Dadurch wurde die Beurteilung der Polarität sehr schwierig. Die Biomatrix ließ sich außerdem nur schlecht pipettieren. Dadurch war nicht nur die Standardisierung der zugesetzten Menge an Biomatrix erschwert, sondern auch der technische Ablauf der funktionellen Untersuchungen an den Follikeln.

3.3. Morphologie der Follikel mit umgekehrter Polarität ("inside-out"-Follikel)

Die von HERZOG und MILLER (24, 25) beschriebene Methode zur Präparation von Follikeln mit umgekehrter Polarität (2.3) ergab eine von Bindegewebsresten, ganzen Follikeln und Einzelzellen weitgehend gereinigte Suspension von Follikelsegmenten. Erst nach einer Inkubationszeit von 20 h in Medium mit 1 % FKS schlossen sich diese Follikelwandfragmente wieder zu ganzen Follikeln zusammen. Die neugebildeten Follikel waren vollständig geschlossen und zeigten eine umgekehrte Polarität, verglichen mit den Schilddrüsenfollikeln in vivo. Das heißt, die Zellkerne lagen an der Innenseite der Schilddrüsenzellen, zum Lumen hin orientiert, während die Mikrovilli nur an der äußeren Zellmembran in Richtung des Medium zu finden waren (Abb. 6). Die apikale Zellmembran der "inside-out"-Follikel war also dem Medium zugekehrt, und die basolaterale Zellmembran dem neuen Lumen. Einige dieser Follikel hatten eine Wand aus einer doppelten Zellreihe. Vereinzelt hatten sich auch Follikel mit umgekehrter Polarität um ein Follikelsegment herum gebildet, das sich dann in ihrem Lumen eingeschlossen fand. Im Lumen der "inside-out"-Follikel wurde kein Protein gefunden.

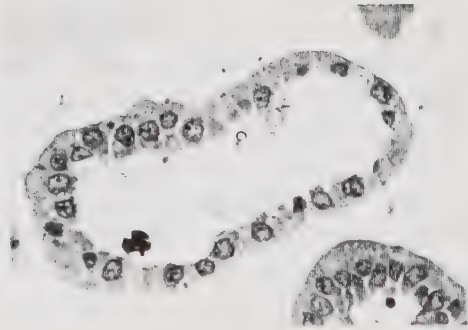


Abbildung 6: Morphologie der Follikel mit umgekehrter Polarität ("inside-out"-Follikel)

Schnitt durch einen Schweineschilddrüsen-follikel mit umgekehrter Polarität nach einem Tag in Kultur. Im Gegensatz zu den Follikeln mit erhaltener Polarität liegen die Zellkerne lumenwärts (basale Membran) und die Mikrovilli (apikale Membran) schauen zum Medium (x 640).

3.4. Vitalität isolierter Follikel

Der Anteil an toten Zellen lag sowohl sofort nach der Präparation, als auch nach 20 Stunden Inkubation im Brutschrank bei etwa 10 % aller Zellen.

Die toten Zellen fanden sich gehäuft in Follikelsegmenten und als Einzelzellen. In intakten Follikeln waren dagegen nur selten einzelne tote Zellen zu erkennen. Allerdings waren tote Einzelzellen manchmal an die intakten Follikel außen angelagert.

3.5. Funktionelle Untersuchungen an isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität

3.5.1. Bildung von cAMP

3.5.1.1. Stimulation der cAMP-Bildung mit TSH

Es wurde der zeitliche Ablauf der cAMP-Bildung nach Stimulation isolierter Follikel mit TSH in Kurzzeit- und Langzeitkinetiken jeweils mit und ohne den Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX untersucht. Außerdem wurde ein Dosis-Wirkungs-Versuch der cAMP-Bildung mit TSH durchgeführt.

Der Kurzzeitversuch zum zeitlichen Verlauf der TSH-Wirkung an isolierten Follikeln unter Hemmung der Phosphodiesterasen mit 0,5 mM IBMX (Abb. 7) ergab bereits 30 s nach Zugabe von 1mU/ml bTSH einen raschen Anstieg der cAMP-Konzentration in den Zellen von 0,3 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,75 pMol cAMP/ μ g DNA. Nach zwei Minuten war der maximale Wert von 1,23 pMol cAMP/ μ g DNA in den Follikeln erreicht.

Fünf Minuten nach Stimulationsbeginn zeigte sich dann wieder ein Konzentrationsabfall des cAMP, der nach zehn Minuten etwa 27 % des Maximalwertes betrug, sodaß man eine unvollständige Blockierung des cAMP-Abbaus annehmen kann.

Der Langzeitversuch über 45 Minuten ohne Hemmung der Phosphodiesterasen (Abb. 8) zeigte fünf Minuten nach Zugabe von 1 mU/ml bTSH nur einen Anstieg von 0,2 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,31 pMol cAMP/ μ g DNA. Zwischen fünf und 45 Minuten nach TSH-Zugabe blieb die cAMP Konzentration in den Zellen weitgehend konstant.

Eine Kurzzeitkinetik ohne Hemmung der Phosphodiesterasen mit einem 2- und 5-Minuten-Wert unter Stimulation mit 1 mU/ml bTSH (Abb. 9) demonstriert nochmals den wesentlich geringeren Anstieg der cAMP-Konzentration bei einem ungehinderten cAMP-Abbau im Vergleich zu dem hohen Anstieg des cAMP-Spiegels bei dem Kurzzeitversuch mit 0,5 mM IBMX.

2 Minuten nach Stimulation mit 1 mU/ml bTSH war das cAMP in den Follikeln ohne IBMX noch nicht angestiegen, während die Follikel mit 0,5 mM IBMX hier bereits ihren Maximalwert erreicht hatten. Nach 5 Minuten stiegen die cAMP-Spiegel in den Follikeln ohne IBMX dann von 0,35 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,6 pMol cAMP/ μ g DNA an, um etwa 80 % des Kontrollwerts. Im Vergleich dazu betrug der Anstieg des cAMP in den Follikeln mit 0,5 mM IBMX nach 5 Minuten rund 300 % der Kontrolle.

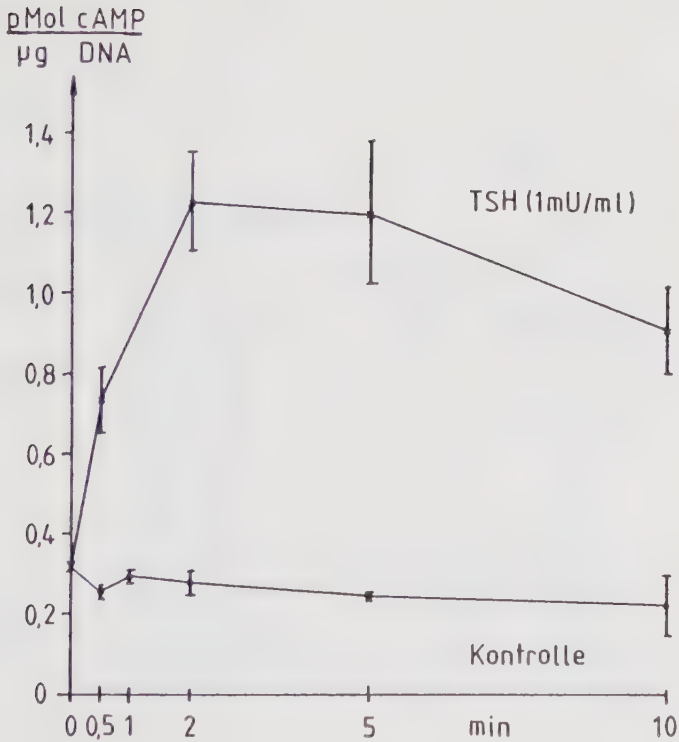


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären cAMP-Spiegel in Follikeln mit erhaltener Polarität nach Stimulation mit 1 mU/ml bTSH.

Die Inkubation wurde in MEM/1 % FKS mit 0,5 mM IBMX durchgeführt. (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes).

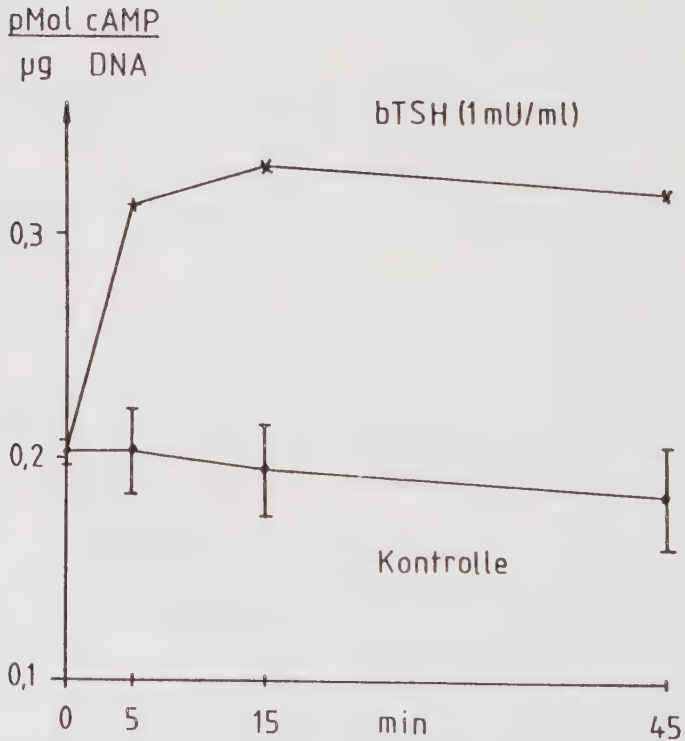


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären cAMP-Spiegel in Follikeln mit erhaltener Polarität nach Stimulation mit 1 mU/ml bTSH bei einer Inkubation ohne Phosphodiesterase-Hemmstoff in MEM/ 1 % FKS (Kontrolle: Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes; bTSH: einfacher Versuchsansatz).

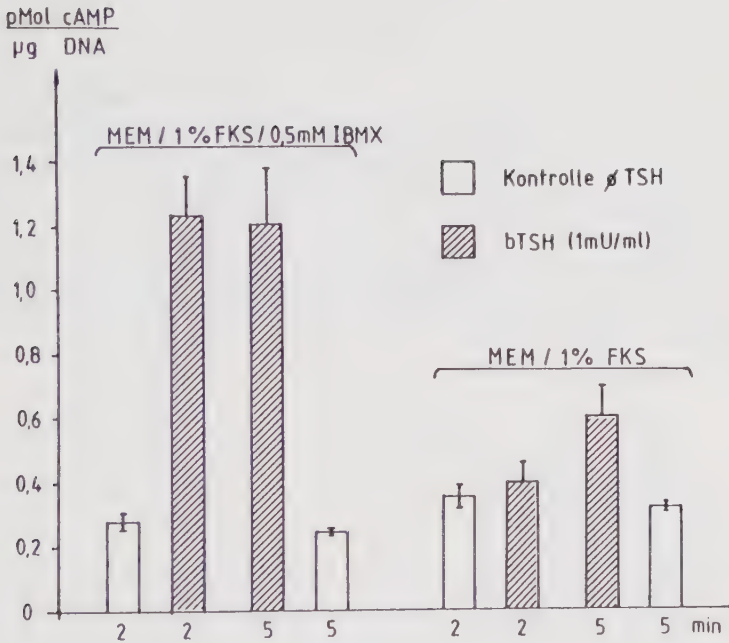


Abbildung 9: Vergleich der intrazellulären cAMP-Spiegel in Follikeln mit erhaltener Polarität nach Stimulation mit 1 mU/ml bTSH mit und ohne Hemmung der Phosphodiesterasen mit 0,5 mM IBMX. Die Inkubation wurde in MEM/1 % FKS mit bzw. ohne 0,5 mM IBMX durchgeführt (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes).

In einem Langzeitversuch mit 1 mM IBMX (Abb. 10) hatten isolierte Follikel nach Zugabe von 1 mU/ml bTSH nach 4 Stunden 47 pMol cAMP/ μ g DNA produziert, fast doppelt soviel wie nach 2 Stunden (27 pMol) cAMP/ μ g DNA).

Der Hauptteil dieser großen cAMP-Mengen wurde dabei nicht in den Zellen, sondern im Medium gemessen, da das cAMP bei den langen Inkubationszeiten und der Blockierung seines Abbaus fast vollständig aus den Zellen austrat.

Im Gegensatz dazu waren bei den Kurzzeitversuchen und den Versuchen ohne IBMX keine signifikanten cAMP-Spiegel im Medium meßbar.

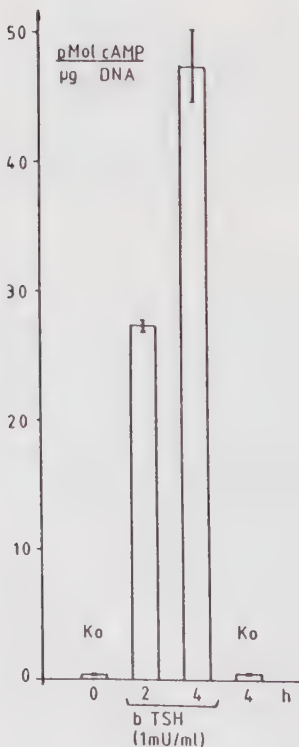


Abbildung 10:
Summe der intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel bei einer Inkubation von Follikeln mit erhaltener Polarität mit 1 mU/ml bTSH in MEM/ 1 % FKS mit 1 mM IBMX zwei und vier Stunden lang bei 37°C (Mittelwerte von zwei verschiedenen Präparationen).

Eine Dosis-Wirkungs-Untersuchung der cAMP-Bildung mit TSH wurde ebenfalls mit einer langen Inkubationszeit von jeweils einer Stunde mit Follikeln in IBMX-Medium (1 mM) zwei Tage nach der Präparation durchgeführt (Abb. 11). Es wurde das intra- und extrazelluläre cAMP gemessen.

Die Follikel mit erhaltener Polarität zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der cAMP-Spiegel bei der Stimulation mit bTSH. Mit 0,1 mU/ml bTSH konnte ein eindeutiger Anstieg auf das dreifache des Kontrollwerts ohne TSH nachgewiesen werden. Bei Zugabe von 1,0 mU/ml bTSH und 100 mU/ml bTSH betrugen die cAMP-Werte das 16- beziehungsweise 32fache des Kontrollwerts ohne TSH.

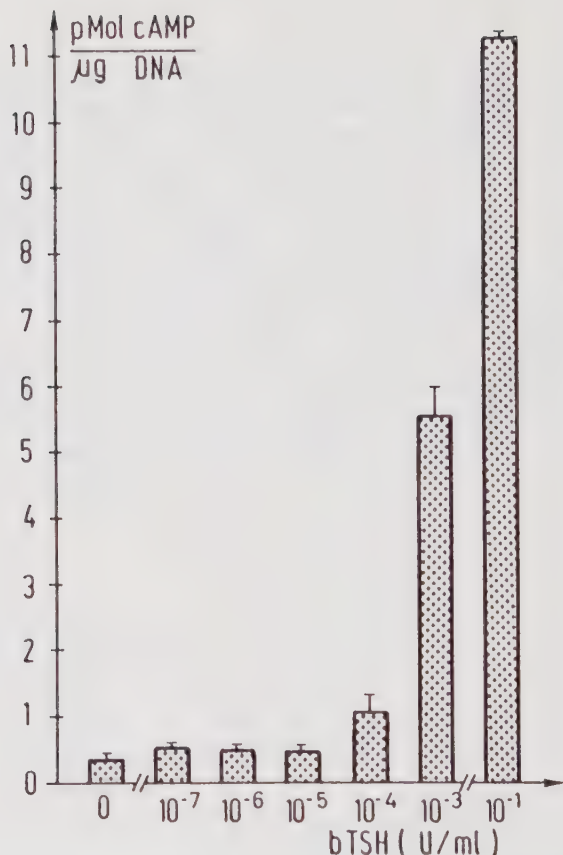


Abbildung 11: Dosis-Antwort-Beziehung der cAMP-Bildung in isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität unter Stimulation mit bTSH.

Die Follikel wurden, nachdem sie 48 Stunden lang im Brutschrank kultiviert worden waren, in MEM mit einem Zusatz von 1 % FKS und 1 mM IBMX eine Stunde lang bei 37°C mit TSH-Konzentrationen von 10^{-7} - 10^{-1} U/ml inkubiert. Dargestellt ist die Summe der intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes).

3.5.1.2. Hemmung des TSH-Effekts mit Jodid

In diesem Versuch wurde der inhibierende Effekt von Jodid in der Regulation der Schilddrüse an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität nachvollzogen.

Der Versuch wurde mit Follikeln, die 20 Stunden in einem Medium mit 1 % FKS und einem Zusatz von 1 μ M KJ vorinkubiert worden waren, durchgeführt im Vergleich zu Kontroll-Follikeln, die 20 Stunden im Standardmedium mit 1 % FKS inkubiert worden waren.

Die Versuchszeiten betrugen 1, 2 und 4 Stunden mit 10 mU/ml bTSH in MEM/1 % FKS/1 mM IBMX. Während sich nach einer Stunde Inkubation noch kein signifikanter Unterschied der cAMP-Werte zeigte (Abb. 12), fanden sich nach zwei Stunden bei den mit Jodid vorinkubierten Follikeln über 60 % niedrigere cAMP-Spiegel (intra- und extrazelluläres cAMP), als bei der Kontrolle. Nach vier Stunden lagen die cAMP-Werte der "Jodid-Follikel" noch immer mehr als 30 % unter denen der jodidfrei vorinkubierten Follikel.

3.5.1.3. Hemmung des TSH-Effekts mit Acetylcholin

Der inhibierende Einfluß von Acetylcholin auf die mit bTSH stimulierte cAMP-Bildung wurde an isolierten Follikeln in einem Versuch ohne Verwendung von IBMX mit einer Versuchszeit von fünf Minuten untersucht.

Bei gleichzeitiger Zugabe von 1 mU/ml bTSH und 10 μ M Acetylcholin zu den isolierten Follikeln wurde der Anstieg der cAMP-Konzentration von 0,34 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,48 pMol cAMP/ μ g DNA, der bei der alleinigen Zugabe von 1 mU/ml bTSH zu erzielen war, vollständig unterdrückt (Abb. 13).

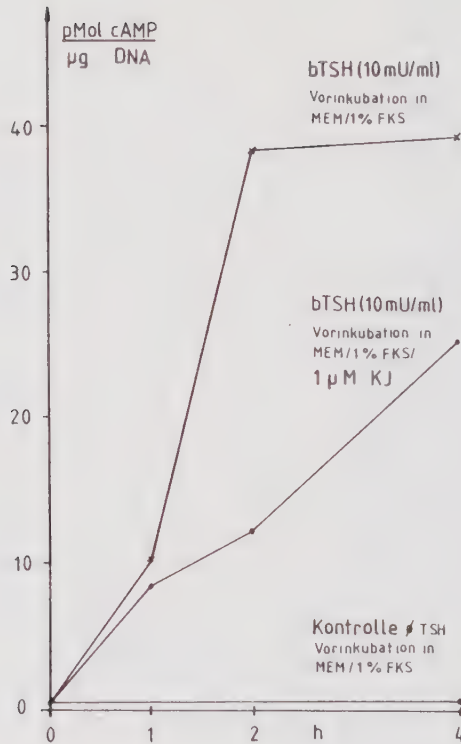


Abbildung 12: Einfluß einer Vorinkubation mit Jodid (1 µM KJ) auf die cAMP-Bildung unter bTSH (10 mU/ml) in Follikeln mit erhaltener Polarität.

Die Follikel wurden nach der Präparation 20 Stunden lang in MEM/1 % FKS mit bzw. ohne 1 µM KJ im Brutschrank vorinkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt (MEM/1 % FKS/1 mM IBMX) und die Summe der intra- und extrazellulären cAMP-Spiegel 1, 2 und 4 Stunden nach TSH-Zugabe bestimmt (einfacher Versuchsansatz).

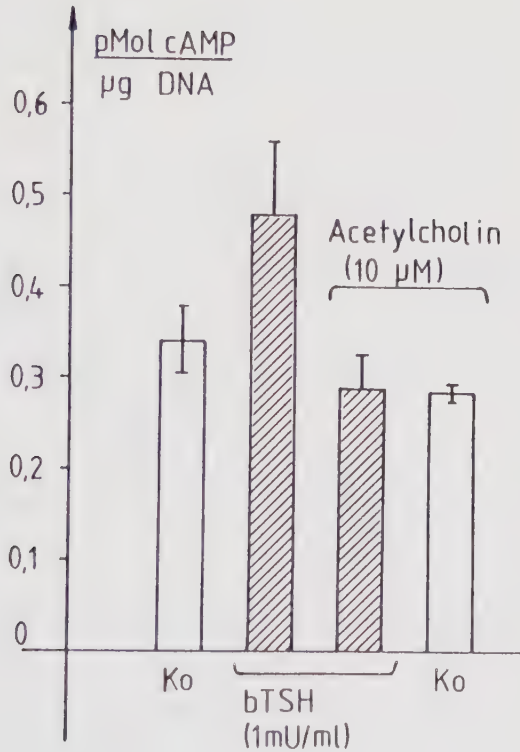


Abbildung 13: Hemmung des Anstiegs des intrazellulären cAMP-Spiegels in Follikeln mit erhaltener Polarität unter bTSH (1 mU/ml) durch die gleichzeitige Zugabe von Acetylcholin (10 µM). Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten in MEM/1 % FKS ohne Phosphodiesterase-Hemmstoff (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes).

Sowohl die cAMP-Konzentration der isolierten Follikel mit Acetylcholin, als auch der cAMP-Wert in den Follikeln mit Acetylcholin und TSH lagen dabei geringfügig niedriger als die Kontrolle.

3.5.1.4. Stimulation der cAMP-Bildung mit Katecholaminen

Es wurde der zeitliche Ablauf der cAMP-Bildung nach Stimulation isolierter Follikel mit Isoproterenol im Vergleich zu TSH in einem Kurzzeitversuch mit IBMX untersucht. Außerdem wurde ein Dosis-Wirkungs-Versuch der cAMP-Bildung mit Isoproterenol durchgeführt. Die rezeptorspezifische Wirkung von Isoproterenol wurde durch den β -Blocker Propranolol überprüft. Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin wurde im Vergleich zu Isoproterenol getestet.

Der Effekt von $1 \mu\text{M}$ Isoproterenol auf die Stimulation der intrazellulären cAMP-Bildung in isolierten Follikeln in einem Medium mit $0,5 \text{ mM}$ IBMX war kürzer, als der Effekt von 1 mU/ml bTSH (Abb. 14). Das Maximum der cAMP-Konzentration unter $1 \mu\text{M}$ Isoproterenol wurde bereits nach einer Minute erreicht und lag bei $0,92 \text{ pMol cAMP}/\mu\text{g DNA}$. Nach diesem Maximalwert fiel die Konzentration des cAMP wieder rasch auf den Ausgangswert ab. Schon zehn Minuten nach Zugabe des Isoproterenol war seine Wirkung nicht mehr nachweisbar.

Im Vergleich dazu wurde der maximale cAMP-Spiegel mit 1 mU/ml bTSH erst nach zwei Minuten mit $1,23 \text{ pMol cAMP}/\mu\text{g DNA}$ erreicht. Es gab ein Plateau des cAMP-Spiegels zwischen zwei und fünf Minuten und der TSH-Effekt war auch nach zehn Minuten noch deutlich zu erkennen.

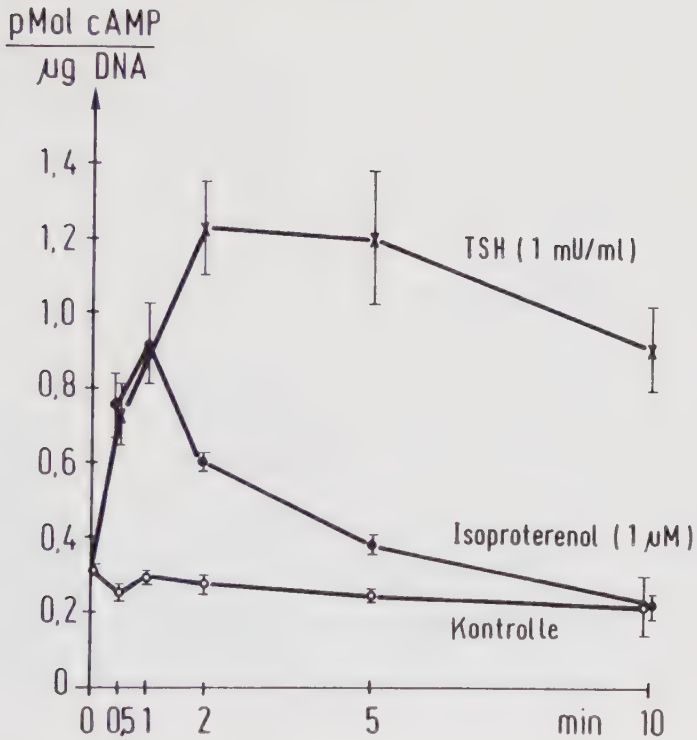


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären cAMP-Bildung in Follikeln mit erhaltener Polarität nach Stimulation mit 1 μ M Isoproterenol (—●—) im Vergleich zum Ablauf bei Stimulation mit 1 mU/ml bTSH (—x—; vgl. Abb. 7). Die Inkubation wurde in MEM/ 1 % FKS mit 0,5 mM IBMX durchgeführt (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes).

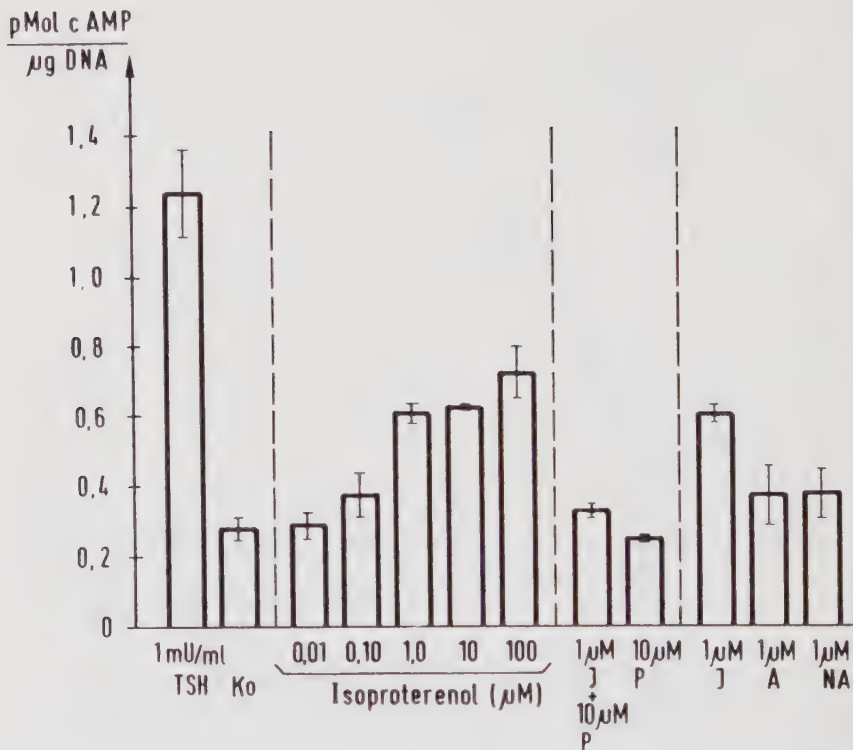


Abbildung 15: Dosis-Antwort-Beziehung der intrazellulären cAMP-Bildung in Follikeln mit erhaltener Polarität unter Katecholaminen (Isoproterenol, I; Adrenalin, A; Noradrenalin, NA) und bTSH (1 mU/ml). Der Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels unter Isoproterenol (1 µM) konnte durch eine zweiminütige Vorinkubation mit Propranolol (P, 10 µM) gehemmt werden. Die Inkubationszeit betrug jeweils zwei Minuten in MEM/1% FKS mit 0,5 mM IBMX (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes).

Follikel mit erhaltener Polarität zeigten bei der Stimulation mit Isoproterenol in einem Versuch mit 0,5 mM/IBMX einen dosisabhängigen Anstieg der cAMP-Spiegel (Abb. 15). Die Zugabe von 0,1 μ M Isoproterenol ergab bei einer Inkubationszeit von 2 Minuten einen signifikanten cAMP-Anstieg in den Zellen von 0,28 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,38 pMol cAMP/ μ g DNA. 100 μ M Isoproterenol erhöhten den intrazellulären cAMP-Spiegel auf 0,72 pMol cAMP/ μ g DNA.

Der Anstieg der cAMP-Konzentration bei Stimulation der Follikel mit 1 μ M Isoproterenol, innerhalb von 2 Minuten von 0,28 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,60 pMol cAMP/ μ g DNA, konnte durch den β -Blocker DL-Propранolol (10 μ M) unterdrückt werden.

Die Zugabe von 1 μ M Adrenalin beziehungsweise 1 μ M Noradrenalin zu isolierten Follikeln bewirkte nach der Inkubationszeit von 2 Minuten nur einen geringfügigen Anstieg des cAMP-Spiegels, vergleichbar der Wirkung von 0,1 μ M Isoproterenol (Abb. 15).

3.5.2. Aufnahme und Organifizierung von Jodid

3.5.2.1. Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Jodid in isolierte Follikel

Der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Jodid in isolierte Follikel nach 20 Stunden Vorinkubation in jodidfreiem Medium wurde indirekt über die Abnahme von radioaktiv markiertem Jodid (^{125}J) im Medium verfolgt (Abb. 16). Zwischen einer und zwei Stunden nach dem Inkubationsbeginn in MEM mit 0,1 μ M KJ (^{127}J) und ca. 300 000 cpm ^{125}J wurde etwa die Hälfte des vorhandenen ^{125}J aus dem Medium

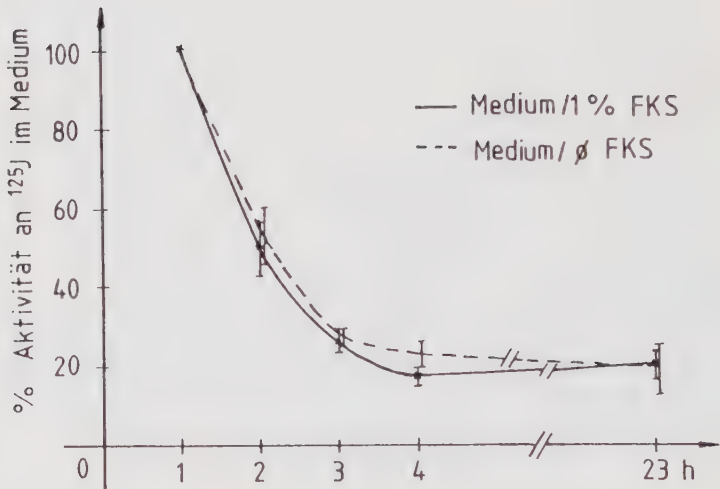


Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf der Aufnahme von Jodid in Follikel mit erhaltener Polarität bestimmt anhand der Abnahme von ^{125}J im Medium.

Die Inkubation wurde in MEM/0,1 μM KJ (^{127}J)/ca. 300 000 cpm ^{125}J mit und ohne Zusatz von 1 % FKS über einen Zeitraum von 23 Stunden durchgeführt (Mittelwerte von sechs Versuchsansätzen $\pm$ Standardabweichung ; 100 % $\hat{=}$ cpm ^{125}J im Medium eine Stunde nach Zugabe des ^{125}J und ^{127}J).

von den Follikeln gespeichert. In den folgenden zwei Stunden wurde zunehmend weniger ^{125}J aufgenommen. Etwa vier Stunden nach Versuchsbeginn hatte die Aufnahme des ^{125}J ihr Plateau erreicht, und es befanden sich ca. 80 % des angebotenen Jodids in den Follikeln.

Zwischen der Aufnahme des ^{125}J in isolierte Follikel in Medium mit 1 % FKS und in Medium ohne FKS ergab sich kein signifikanter Unterschied.

3.5.2.2. Aufnahme und Organifizierung von Jodid nach Zugabe von TSH

Nach zehn Minuten hatten Follikel mit erhaltener Polarität, die mit 1 mU/ml bTSH stimuliert worden waren, ca. 1,2 pMol KJ/ μg DNA gespeichert, ca. 25 % mehr als die Follikel ohne TSH, die zu diesem Zeitpunkt ca. 0,9 pMol KJ/ μg DNA aufgenommen hatten (Abb. 17). Im Vergleich zur Kontrolle war also die Aufnahme von Jodid innerhalb der ersten zehn Minuten in den Follikeln mit TSH gesteigert.

Nach weiteren 20 Minuten zeigte sich die Jodidmenge in den Follikeln mit TSH konstant, während die Follikel ohne TSH jetzt mit durchschnittlich 1,6 pMol KJ/ μg DNA eine größere Menge Jodid gespeichert hatten.

Der prozentuale Anteil des in TCA-fällbare Proteine eingebauten Jodids lag in den Follikeln mit TSH zu beiden Zeitpunkten, 10 und 30 Minuten, deutlich höher, als in den Follikeln ohne TSH (Abb. 18). So steigerte 1 mU/ml bTSH in 10 Minuten die Rate an organifiziertem Jod von ca. 30 % (Kontrolle) auf ca. 66 % des aufgenommenen Jodids in den Follikeln. Während aber der Anteil an organifiziertem Jod in den Follikeln mit TSH nach 30 Minuten leicht abgenommen hatte, auf ca. 63 %, war er bei

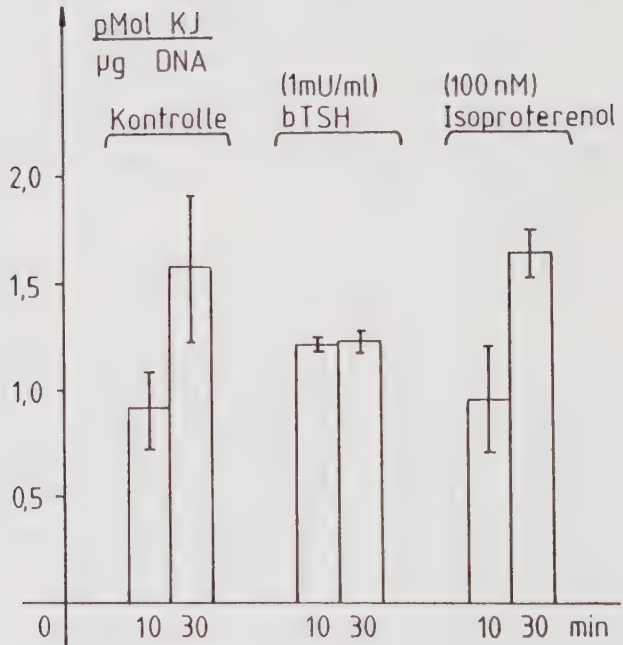


Abbildung 17: Aufnahme von Jodid in Follikel mit erhaltener Polarität nach 10 und 30 Minuten und Einfluß von bTSH (1 mU/ml) oder Isoproterenol (100 nM)

Die Inkubationen wurden in MEM/1% FKS mit einem Zusatz von $0,1 \mu\text{M}$ KJ (^{127}J) und ca. 150 000 cpm ^{125}J durchgeführt. Die prozentuale Aufnahme des ^{125}J in die Follikel wurde in pMol KJ umgerechnet und auf die DNA-Menge (μg) bezogen. (Mittelwerte eines doppelten Versuchssatzes).

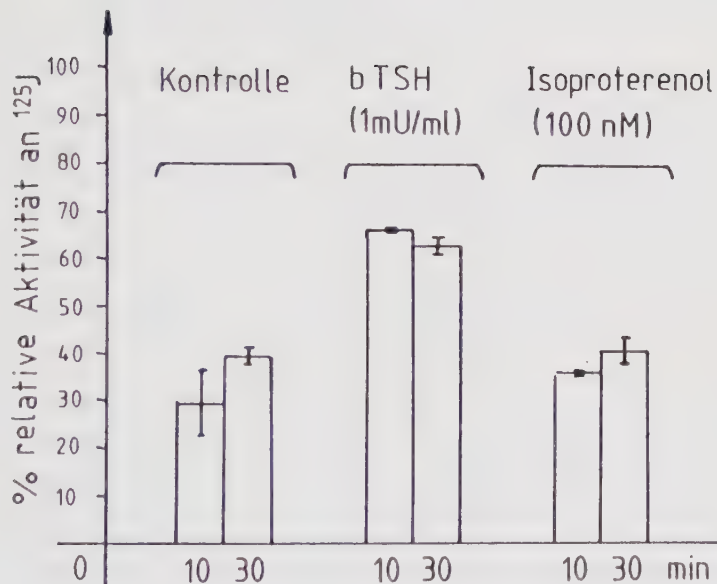


Abbildung 18: Organifizierung von Jodid in den Follikeln mit erhaltener Polarität nach 10 und 30 Minuten und Einfluß von bTSH (1 mU/ml) oder Isoproterenol (100 nM).

Die Inkubationen wurden in MEM/12% FKS mit einem Zusatz von 0,1 μM KJ (^{125}J) und ca. 150 000 cpm ^{125}J durchgeführt. Die Organifizierung des Jodids ist dargestellt als Anteil des ^{125}J in TCA fällbare Proteine eingebauten ^{125}J in Prozent des in die Follikel aufgenommenen ^{125}J (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes; nicht DNA-korrigiert).

der Kontrolle ohne TSH zu diesem Zeitpunkt auf ca. 40 % angestiegen.

Die Tendenz zur Abnahme des organifizierten Jods in den Follikeln mit TSH nach 30 Minuten trat bei der Korrelation der prozentualen Werte zur gemessenen DNA (zwischen 6 und 8 μ g) etwas stärker hervor.

Der Anteil an organifiziertem Jod in den Follikeln wuchs also unter der Stimulation mit TSH rasch an und nahm nach 10 Minuten bereits wieder leicht ab.

3.5.2.3. Aufnahme und Organifizierung von Jodid nach Zugabe von Isoproterenol

Die Aufnahme von Jodid in isolierte Follikel mit erhaltener Polarität 10 und 30 Minuten nach Zugabe von 100 nM Isoproterenol verlief ohne signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten (Abb. 17).

Der Anteil an organifiziertem Jod lag in den Follikeln mit Isoproterenol nach 10 Minuten mit ca. 36 % etwa ein Sechstel höher als in den Kontrollen mit ca. 30 % organifiziertem Jod (Abb. 18). Nach 30 Minuten war dieser Unterschied nicht mehr sichtbar. Sowohl die Follikel mit, als auch ohne Isoproterenol hatten zu diesem Zeitpunkt ca. 40 % des aufgenommenen Jodids organifiziert.

Bei der Korrelation der prozentualen Werte zur gemessenen DNA (zwischen 6 und 10 μ g) war der Anteil an organifiziertem Jod in den Follikeln mit Isoproterenol nach 10 Minuten nicht signifikant höher als in den Kontrollen.

3.5.3. Untersuchung der funktionellen Differenzierung der Follikel mit erhaltener Polarität nach einem beziehungsweise sechs Tagen in Kultur

Sowohl die Aufnahme, als auch der Einbau von ^{125}J in TCA-fällbare Proteine wurden bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Follikeln gemessen, die einen beziehungsweise sechs Tage in Kultur im Brutschrank gehalten worden waren. Mit diesem Versuch wurde anhand des schilddrüsen-spezifischen Parameters der Aufnahme und Organifizierung von Jodid die funktionelle Differenzierung der Follikel mit erhaltener Polarität in Kultur untersucht.

Die isolierten Follikel zeigten nach der Kulturzeit von sechs Tagen in MEM / 1% FKS im Brutschrank mit einem einmaligen Mediumwechsel nach drei Tagen eine deutlich reduzierte Aufnahme von Jodid gegenüber den Follikeln, die nur einen Tag kultiviert worden waren (Abb. 19). Sowohl mit, als auch ohne bTSH (1 mU/ml) im Inkubationsmedium war die Aufnahme von Jodid in den Follikeln, die sechs Tage in Kultur gewesen waren, um etwa zwei Drittel im Vergleich zu den einen Tag alten Follikeln reduziert.

Der Anteil an organifiziertem Jod in Prozent des aufgenommenen Jodids lag bei den einen Tag alten Follikeln ohne TSH bei ca. 61 % nach 30 Minuten Inkubation und wurde mit 1 mU/ml bTSH auf ca. 82 % gesteigert (Abb. 19). Dagegen hatten die sechs Tage alten Follikel ohne TSH nach 30 Minuten nur ca. 40 % des aufgenommenen Jodids organifiziert und mit 1 mU/ml bTSH nur ca. 52 %.

Es war also sowohl die Fähigkeit zur Aufnahme, als auch zur Organifizierung von Jodid bei den sechs Tage alten Follikeln beeinträchtigt.

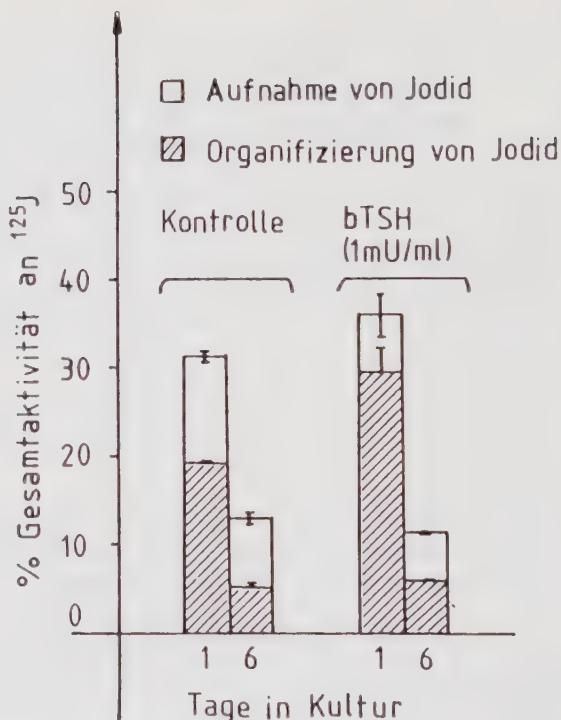


Abbildung 19: Untersuchung der funktionellen Differenzierung der Follikel mit erhaltener Polarität nach einem bzw. sechs Tagen in Kultur.

Aufnahme und Organifizierung von ^{125}J in den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität nach einem bzw. sechs Tagen Kultur im Brutschrank und Einfluß einer Zugabe von bTSH (1 mU/ml). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten in MEM/1 % FKS/ca. 150 000 cpm ^{125}J . Aufnahme und Organifizierung des Jodids wurden in Prozent der zugesetzten Gesamtaktivität an ^{125}J aufgetragen. (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes, nicht DNA-korrigiert).

3.6. Funktionelle Eigenschaften isolierter Follikel mit erhaltener Polarität im Vergleich zu Follikeln mit umgekehrter Polarität

3.6.1. Bildung von cAMP

Die Follikel mit umgekehrter Polarität zeigten bei der Stimulation mit der hohen TSH-Dosis von 100 mU/ml unter Hemmung der Phosphodiesterasen mit 1 mM IBMX eine wesentlich geringere Stimulation der intrazellulären cAMP-Bildung, als die Follikel mit erhaltener Polarität (Abb. 20).

Follikel mit erhaltener Polarität hatten 30 Minuten nach TSH-Zugabe bereits einen cAMP-Spiegel von 25 pMol cAMP/ μ g DNA erreicht, die Follikel mit umgekehrter Polarität dagegen nur einen cAMP-Spiegel von 5 pMol cAMP/ μ g DNA. Nach einer Stunde stieg der cAMP-Spiegel in den Follikeln mit umgekehrter Polarität dann auf 10 pMol cAMP/ μ g DNA an, während er bei den Follikeln mit erhaltener Polarität auf 24 pMol cAMP/ μ g DNA abfiel. Dieser Abfall der cAMP-Konzentration ist durch den Austritt des weitergebildeten cAMP ins Kulturmedium (hier nicht gemessen) zu erklären.

Im Gegensatz zu den Follikeln mit erhaltener Polarität wurde bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität in Versuchen mit kurzen Inkubationszeiten (bis zu 10 Minuten) nach Stimulation mit bTSH kein Anstieg der cAMP-Spiegel gefunden.

Auch bei Zugabe von Katecholaminen zeigten die Follikel mit umgekehrter Polarität keine Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Zellen im Unterschied zu den Follikeln mit erhaltener Polarität.

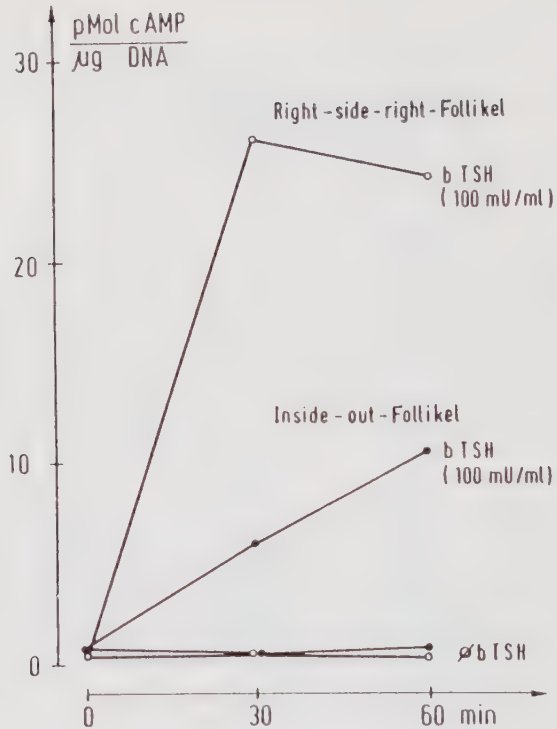


Abbildung 20: Einfluß von bTSH (100 mU/ml) auf die intrazellulären cAMP-Spiegel in Follikeln mit erhaltener ("right-side-right"-Follikel; ○) und mit umgekehrter ("inside-out"-Follikel; ●) Polarität. Die Inkubationen wurden 30 und 60 Minuten lang in MEM/1 % FKS mit einem Zusatz von 1 mM IBMX bei 37°C durchgeführt (einfacher Versuchsansatz).

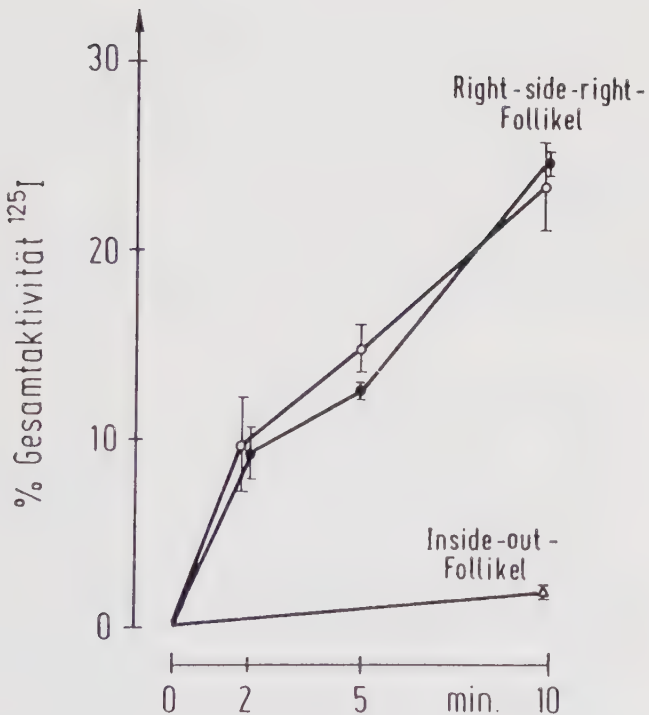


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^{125}J in Follikel mit erhaltener ("right-side-right"-Follikel) und mit umgekehrter ("inside-out"-Follikel) Polarität und Einfluß von bTSH (o: bTSH 1 mU/ml; •: ø bTSH).

Die Aufnahme des Jodids in die Follikel wurde in Prozent der zugesetzten Gesamtaktivität an ^{125}J bestimmt (Mittelwerte eines doppelten Versuchsansatzes; nicht DNA-korrigiert).

3.6.2. Aufnahme von ^{125}J

Isolierte Follikel mit erhaltener Polarität zeigten bereits nach zwei Minuten eine Speicherung von ca. 10 % der zugesetzten Gesamtaktivität an ^{125}J und nach zehn Minuten eine Speicherung von ca. 25 %. Diese rasche Aufnahme von Jodid durch die Follikel mit erhaltener Polarität konnte durch 1 mU/ml bTSH nicht zusätzlich gesteigert werden (siehe Abb. 21).

Im Gegensatz dazu konnte bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität auch nach zehn Minuten Inkubationszeit keine signifikante Aufnahme von ^{125}J festgestellt werden.

3.6.3. Freisetzung von Thyroxin

Isolierte Follikel mit erhaltener Polarität sezernierten nach einer 14stündigen Inkubation mit TSH deutlich meßbar Schilddrüsenhormone in das Inkubationsmedium (Abb. 22). Sowohl bei einer Konzentration von 1 mU/ml bTSH, als auch von 100 mU/ml bTSH im Medium wurden über 24 h etwa gleich hoch ansteigende T_4 -Mengen in den Schalen (pro Schale ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen) gemessen. Die Follikel ohne TSH setzten während einer Inkubationszeit von 14 h nur 5 ng T_4 pro Schale ins Medium frei. Die mit TSH stimulierten Follikel sezernierten in dieser Zeit 40 ng T_4 pro Schale.

Die Follikel mit umgekehrter Polarität setzten im Gegensatz zu den Follikeln mit erhaltener Polarität auch nach Stimulation mit 100 mU/ml bTSH kaum Schilddrüsenhormon ins Medium frei (siehe Abb. 23). Erst nach Zugabe von Thyreoglobulin vom Schwein zum Inkubationsmedium waren die Follikel mit umgekehrter Polarität in der Lage unter Stimulation mit bTSH vergleichbare Mengen an T_4 zu bilden, wie die isolierten Follikel mit erhaltener Polarität.

Nach 15 Stunden fanden sich bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität in Medium mit 5 mg/ml Thyreoglobulin und 100 mU/ml bTSH 30 ng T_4 pro Schale.

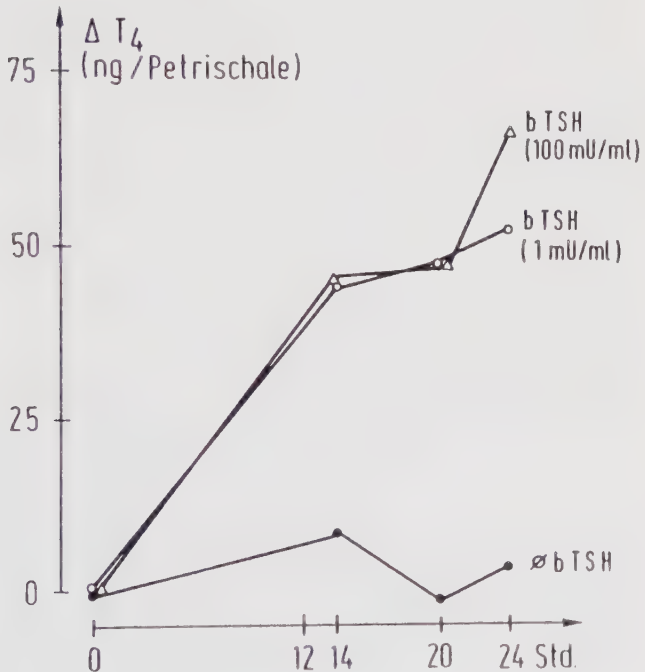


Abbildung 22: Freisetzung von T_4 ins Medium aus Follikeln mit erhaltener Polarität nach Stimulation mit bTSH über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Die Inkubation wurde in MEM/1 % FKS in Petriperm-Schalen (pro Schale ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen) im Brutschrank durchgeführt (einfacher Versuchsansatz).

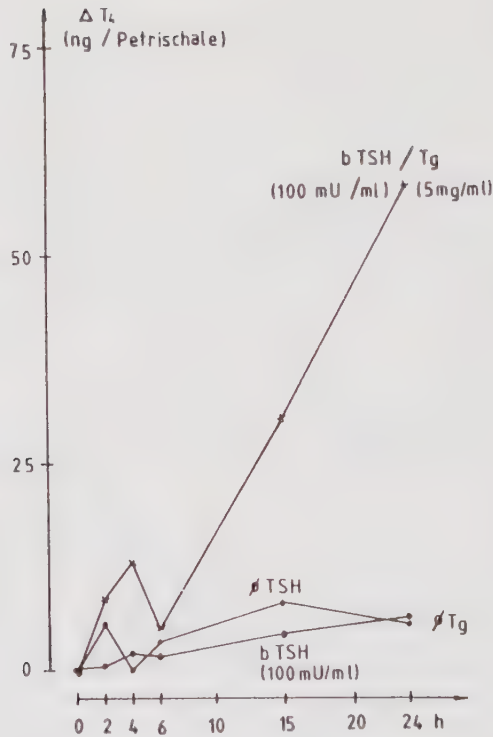


Abbildung 23: Freisetzung von T_4 ins Medium aus Follikeln mit umgekehrter Polarität über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Stimulation mit bTSH (100 mU/ml) und Zugabe von Thyreoglobulin vom Schwein (5 mg Tg/ml) zum Inkubationsmedium.

Die Inkubation wurde in MEM mit einem Zusatz von 0,18 % Human-Albumin in Petriperm-Schalen im Brutschrank durchgeführt (einfacher Versuchsansatz).

Die nach der Methode von HERZOG und MILLER (25) präparierten Follikelsegmente waren davor etwa 24 Stunden in MEM/10 % FKS im Brutschrank kultiviert worden, bis sich die Follikel mit umgekehrter Polarität gebildet hatten.

4. DISKUSSION

Einfluß von Präparationsmethodik und Inkubationsbedingungen auf die Polarität isolierter Schilddrüsenfollikel

Das zentrale Problem bei der Entwicklung der Präparationsmethode isolierter Schilddrüsenfollikel war die Erhaltung ihrer normalen Polarität in der Kultur. Die Ausschaltung möglicher Ursachen für eine Polaritätsumkehr und die Suche nach den stabilisierenden Faktoren der polaren Struktur isolierter Follikel standen daher im Mittelpunkt bei der Entwicklung der Methode. Auf Grund der in der Literatur beschriebenen Beobachtungen über eine Polaritätsumkehr an Schilddrüsenfollikeln (22, 24, 25, 44) untersuchten wir sowohl den Einfluß der Präparationsmethodik, als auch der Inkubationsbedingungen auf die Polarität isolierter Schweineschilddrüsenfollikel.

Verschiedene Autoren beschreiben eine Polaritätsänderung bei Schilddrüsenfollikeln von Ratte beziehungsweise Mensch in Kultur innerhalb von drei bis fünf Tagen beziehungsweise 24 Stunden nach Erhöhung der FKS-Konzentration im Kulturmedium von 0,5 % auf 5 % beziehungsweise 10 % (22, 23, 44).

Bei den isolierten Schweineschilddrüsenfollikeln mit erhaltener Polarität fand sich nach sechs Tagen in Kultur im Brutschrank in Medium mit einer Konzentration von 5 % FKS ein unveränderter Anteil von ca. 80 % "right-side-right"-Follikeln. Ein Einfluß der Erhöhung der FKS-Konzentration im Inkubationsmedium (von 1 % auf 5 %) auf die Ausrichtung der Polarität konnte also an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität nicht nachvollzogen werden.

Außer der Morphologie nach sechs Tagen in Kultur wurde auch die funktionelle Differenzierung der isolierten Follikel mit erhaltener Polarität nach einer Kulturzeit von sechs Tagen, allerdings nur in Medium mit 1 % FKS, vergleichend zu den einen Tag alten Follikeln untersucht. Dabei wurden die schilddrüsenspezifischen Parameter der Aufnahme und Organifizierung von Jodid an den isolierten Follikeln, die einen beziehungsweise sechs Tage in Kultur gehalten worden waren, als Maß der intakten Funktion benutzt.

Es zeigte sich dabei nach sechs Tagen Kultur eine Reduktion der Jodidaufnahme in die Follikel um zwei Drittel gegenüber der Kontrolle nach einem Tag in Kultur. Auch der Anteil des organifizierten Jods sank von ca. 61 % in Follikeln ohne TSH nach einem Tag Kultur auf ca. 40 % nach sechs Tagen Kultur.

Die akute Stimulierbarkeit der Organifizierung nach 30 Minuten mit 1 mU/ml bTSH hatte in den Follikeln nach sechs Tagen Kultur ebenfalls abgenommen, von ca. 82 % organifiziertem Jod in Follikeln mit TSH nach einem Tag in Kultur auf ca. 52 % nach sechs Tagen in Kultur.

In Schilddrüsenzell-Präparationen nimmt die Jodidaufnahme in die Thyreozyten bei einer mehrtägigen Kultur in Medium ohne TSH stark ab (34, 55, 56). Einige Autoren schlossen daraus, daß TSH notwendig ist, um die Differenzierung von isolierten Schilddrüsenzellen in Kultur aufrechtzuerhalten (34). Diese Vermutung wurde auch durch die Beobachtung unterstützt, daß TSH die Bildung follikelähnlicher Strukturen mit erhaltener Polarität in Monolayer-Kulturen von Schilddrüsenzellen induzierte (31, 38).

Ein echter Einfluß von TSH auf die Differenzierung seines Zielgewebes Schilddrüse wird jedoch in der Literatur noch kontrovers diskutiert (11).

Die Rate der Aufnahme und Organifizierung von Jodid, sowie die akute Stimulierbarkeit mit TSH hatten nach den sechs Tagen Kultur in Medium mit 1 % FKS in den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität zwar stark abgenommen, die Fähigkeit zur Aufnahme und Organifizierung von Jodid war aber grundsätzlich erhalten geblieben. Daher handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine echte, funktionelle Entdifferenzierung der Thyreozyten in den isolierten Follikeln, sondern um eine Art funktionelle Ruhephase bei einem Fehlen der tonischen Kontrolle durch TSH (11).

Da die Langzeitwirkungen von TSH an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität noch nicht untersucht wurden, muß ich mich an dieser Stelle auf Vermutungen beschränken.

Auch die Möglichkeit mit TSH die Bildung von Follikeln mit erhaltener Polarität in Suspensionskulturen präparierter Thyreozytenaggregate zu induzieren (29), also ein Einfluß von TSH auf die Polarität, wurde an den isolierten Schweineschilddrüsenfollikeln nicht untersucht.

Der Grund dafür war, daß die Präparationsmethodik den Vorrang vor den Inkubationsbedingungen bei der Gewinnung der isolierten Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität erhielt.

Im Gegensatz zu den vielen in der Literatur beschriebenen Methoden der Präparation von Thyreozytenaggregaten (22, 23, 29, 43), Follikelsegmenten (25) oder Einzelzellen (16, 31, 38) und der sekundären Gewinnung von Follikeln mit unterschiedlicher Polarität oder der Induktion follikelähnlicher Strukturen durch verschiedene Inkubationsbedingungen, sollte eine Methode zur Isolierung ganzer, intakter Schilddrüsenfollikel entwickelt werden.

Daher wurde als Grundprinzip der neuen Methode das Schilddrüsengewebe nicht zerkleinert in eine Kollagenaselösung gegeben, sondern die Kollagenaselösung in die Arterie einer ganzen Schilddrüse eingespritzt und das Gewebe erst nach der Inkubation zerteilt. Nur so konnte die Kollagenase über das Gefäßsystem an die intakten Schilddrüsenfollikel herangebracht werden und sie schonend aus ihrem Bindegewebsgerüst lösen. Nach der Inkubation konnte man dann sogar makroskopisch auf einer dunklen Unterlage beobachten, daß die Follikel beim vorsichtigen Auseinanderziehen des verdauten Gewebes an den Bindegewebssepten direkt aus dem Gewebe ins Medium fielen und sich wie feiner Gries darin verteilten. Außerdem wurde bei der neuen Methode darauf geachtet, daß das Gewebe nie grob geschüttelt wurde, um die Follikel herauszulösen, daß die Follikel beim Waschen nur einfach der Schwere nach absedimentierten zur Abtrennung von Follikelsegmenten und Einzelzellen, und daß größere Bindegewebsflocken und Aggregate von Follikeln mit einer Pipette von Hand aus der Follikelsuspension ausgelesen wurden.

Es wurde bei allen Schritten der Präparationsmethode erstens eine mögliche mechanische Schädigung der intakten Follikelstruktur vermieden und zweitens eine völlige Abtrennung der Bindegewebsreste. Die kleinen Bindegewebsteile, die bei der Kollagenaseverdauung entstanden waren und die an den Follikeln anhaftenden Bindegewebsfasern, Bestandteile ihrer Basalmembran und der extrazellulären Grundsubstanz, wurden als "Stabilisatoren der Polarität" erhalten.

Aus anderen Zellsystemen ist bekannt, daß die Basalmembran eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Differenzierung der Zellen *in vitro* spielt (47).

Nach der mechanischen Zerkleinerung der Schilddrüse und der anschließenden Inkubation mit Kollagenase ist die Basalmembran um Follikel und Follikelsegmente vollständig entfernt (18, 25, 43).

GARBI et al. untersuchten die Voraussetzungen für die Bildung neuer Basalmembran um Schilddrüsenfollikel in Kultur (17). Sie zeigten, daß die Zugabe von gereinigtem Kollagen allein nicht ausreicht, um die Basalmembranbildung zu induzieren, sondern erst die Zugabe einer niedrigen Konzentration von Laminin, das selbst ein Bestandteil der Basalmembran ist. Es fand sich außerdem, daß die Basalmembran nur an der basalen Oberfläche der Thyreozyten entsteht, und daß bereits nach einer halben Stunde die ersten kurzen Abschnitte von neugebildeter Basalmembran zu sehen sind.

Auf Grund dieser Beobachtungen in der Literatur wurde mit der neuen Präparationsmethode zumindest die Erhaltung von Basalmembranresten um die intakten Follikel mit erhaltener Polarität angestrebt.

Die methodischen Vorversuche und der Einsatz der Biomatrix konnten die entscheidende Bedeutung einer Interaktion der Zellmembran mit bestimmten extrazellulären Komponenten bei der Orientierung und Stabilisierung der zellulären Polarität der Thyreozyten bestätigen.

In den Vorversuchen wurde angestrebt, die frisch aus dem Gewebe gewonnenen, intakten Follikel möglichst weitgehend von allen anhaftenden Bindgewebsfasern zu reinigen. Die Follikelsuspension wurde durch Nylonnetze filtriert, um einerseits große Follikelaggregate und Bindegewebssteile abzufangen und andererseits auch die vielen kleinen Bindegewebsreste durch Adsorption an das Nylogitter zu beseitigen. Außerdem wurde die Follikelsuspension zur Ab-

trennung der Follikelsegmente und Einzelzellen zentrifugiert und nicht einfach sedimentiert.

Die Ausbeute an Follikeln mit erhaltener Polarität war bei diesem Vorgehen vergleichsweise gering, und es fand sich ein großer Anteil an aufgerissenen Follikeln und Follikelsegmenten in der Suspension. Dem entsprechend erwies sich auch die polare Struktur der filtrierten und zentrifugierten Follikel als sehr instabil. Nach 20 Stunden Inkubation in Medium mit 1 % FKS lagen zum größten Teil Follikel mit umgekehrter Polarität vor.

Es läßt sich vermuten, daß die Follikel durch die Zentrifugation mechanisch geschädigt wurden. Außerdem führte die Filtration durch die Nylonnetze anscheinend dazu, daß auch viele intakte Follikel zusammen mit den anhaftenden Bindegewebsfasern und Basalmembranresten im Netz zurückblieben.

Durch die Nylonnetze wurde also nicht nur das stabilisierende Bindegewebe entfernt, sondern auch zusätzlich eine Art "Negativauslese" geleistet, indem intakte Follikel mit ihren Bindegewebsresten abfiltriert wurden.

Die Inkubationsbedingungen dieser instabilen, filtrierten und zentrifugierten Follikel wurden in weiteren Versuchen durch die Zugabe der Biomatrix aus Schweineschilddrüsen verändert. Die Biomatrix wurde in Anlehnung an die Methode von ROJKIND et al. präpariert (47). Die Autoren hatten gezeigt, daß Rattenleberzellen in Kultur in einem hohen Prozentsatz an einer Biomatrix aus Rattenleber hafteten und dabei nicht nur ihre Überlebenszeit beträchtlich verlängerten, sondern auch einige ihrer leberspezifischen Funktionen beibehielten.

Auch an Schilddrüsenzellen gibt es Beobachtungen aus der Literatur, daß eine extrazelluläre Matrix für die Ausrichtung der Polarität wichtig ist (5).

Den filtrierten und zentrifugierten Follikeln wurde daher die zuerst bei der Präparation entfernte extrazelluläre Matrix bei der Inkubation wieder als Biomatrix, in Form von isolierten Bindegewebsfasern, Basalmembrankomponenten und Grundsubstanz, zugeführt.

Es zeigte sich tatsächlich nach 20 Stunden Inkubation ein größerer Anteil an Follikeln mit erhaltener Polarität und beginnender Auffüllung der Lumina mit Kolloid, als bei der Inkubation der filtrierten und zentrifugierten Follikel allein in Medium mit 1 % FKS. Die Biomatrix brachte jedoch erhebliche technische Schwierigkeiten mit sich. Die Follikel hängten sich, wie es auch von ROJKIND et al. für Rattenleberzellen beschrieben wurde (47), an die Matrix an und bildeten große Aggregate, in denen die Polarität einzelner Follikel nur schwer zu beurteilen war. Außerdem ließ sich die Biomatrix nur schlecht pipettieren. Dadurch wurde sowohl die Standardisierung der zugesetzten Menge, als auch der Ablauf der funktionellen Untersuchungen an den Follikeln erschwert.

Diese Ergebnisse führten dazu, daß die Präparationsmethode, wie bereits beschrieben, abgeändert wurde. Die frisch aus dem Gewebe isolierten, intakten Follikel wurden nicht mehr durch Nylonnetze filtriert und auch nicht mehr zentrifugiert, sondern große Bindegewebesteile und Aggregate von Follikeln wurden mit einer Pipette von Hand aus der Suspension herausgelesen und die Follikel wurden beim Waschen zur Abtrennung der Follikelsegmente und Einzelzellen nur sedimentiert.

Die so entstandene, schonende Methode zur Präparation isolierter Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität lieferte eine Suspension von Follikeln zusammen mit Resten ihrer extrazellulären Matrix und erbrachte ca. 80 % "right-side-right"-Follikel in Kultur.

Durch die Wahl der Methode konnte die mechanische Schädigung der intakten Follikelstruktur bei der Präparation, eine wichtige Ursache der Polaritätsumkehr, deutlich verringert werden. Außerdem wurde ebenfalls durch die Methode die Erhaltung stabilisierender Faktoren der polaren Struktur isolierter Follikel gefördert, indem Teile der bindegewebigen, extrazellulären Matrix in der Follikelsuspension und an den Follikeln selbst belassen werden konnten.

Die Polarität dieser isolierten Follikel war auch bei einer sechstägigen Kultur in Medium mit der hohen Konzentration von 5 % FKS stabil.

Auf Grund dieser Ergebnisse läßt sich schließen, daß der Präparationsmethode die entscheidende Bedeutung bei der Gewinnung intakter Follikel mit erhaltener Polarität zukommt und daß die Inkubationsbedingungen eine untergeordnete Rolle spielen.

Morphologische Charakterisierung des entwickelten in-vitro-Modells

Mit der von uns entwickelten Methode zur Präparation von Schweineschilddrüsenfollikeln erhielten wir eine Suspension von ca. 80 % Follikeln mit erhaltener Polarität. Die Zellkerne lagen nahe der basolateralen Zellmembran der Thyreozyten. An der Außenseite der Follikel, der basalen Zellmembran, waren teilweise noch Reste von Bindegewebe, unvollständig abgebaute Kollagenfasern, zu erkennen. Die Mikrovilli der apikalen Zellmembran waren zum Lumen hin gerichtet. Zum Teil waren die Lumina mit Kolloid gefüllt.

Daneben fanden sich ca. 10 % Follikel mit umgekehrter Polarität in der Suspension und ca. 10 % Follikel, die

nach den histologischen Kriterien nicht eindeutig zuzuordnen waren. Zwischen den intakten, geschlossenen Follikeln (mittlerer Durchmesser zwischen 100 und 200 μm) gab es nur wenige aufgerissene Follikel, Follikelsegmente und Einzelzellen.

In den isolierten Follikeln waren bei Vitalfärbungen nur vereinzelt tote Zellen zu finden. Dagegen waren in Follikelsegmenten oft gehäuft tote Zellen, und auch die meisten noch in der Suspension verbliebenen Einzelzellen waren tot.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden war die Funktionstüchtigkeit der isolierten Follikel in Kultur an ihrer beginnenden Abrundung und Aufblähung durch die Auffüllung mit neusynthetisiertem Thyreoglobulin unter dem Lichtmikroskop zu erkennen.

Die isolierten Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität wurden nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell charakterisiert. Die Überprüfung bekannter, wichtiger Funktionen und Regulationswege der Schilddrüse an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität diente dem Nachweis der Intaktheit dieser kleinsten funktionellen Einheiten der Schilddrüse.

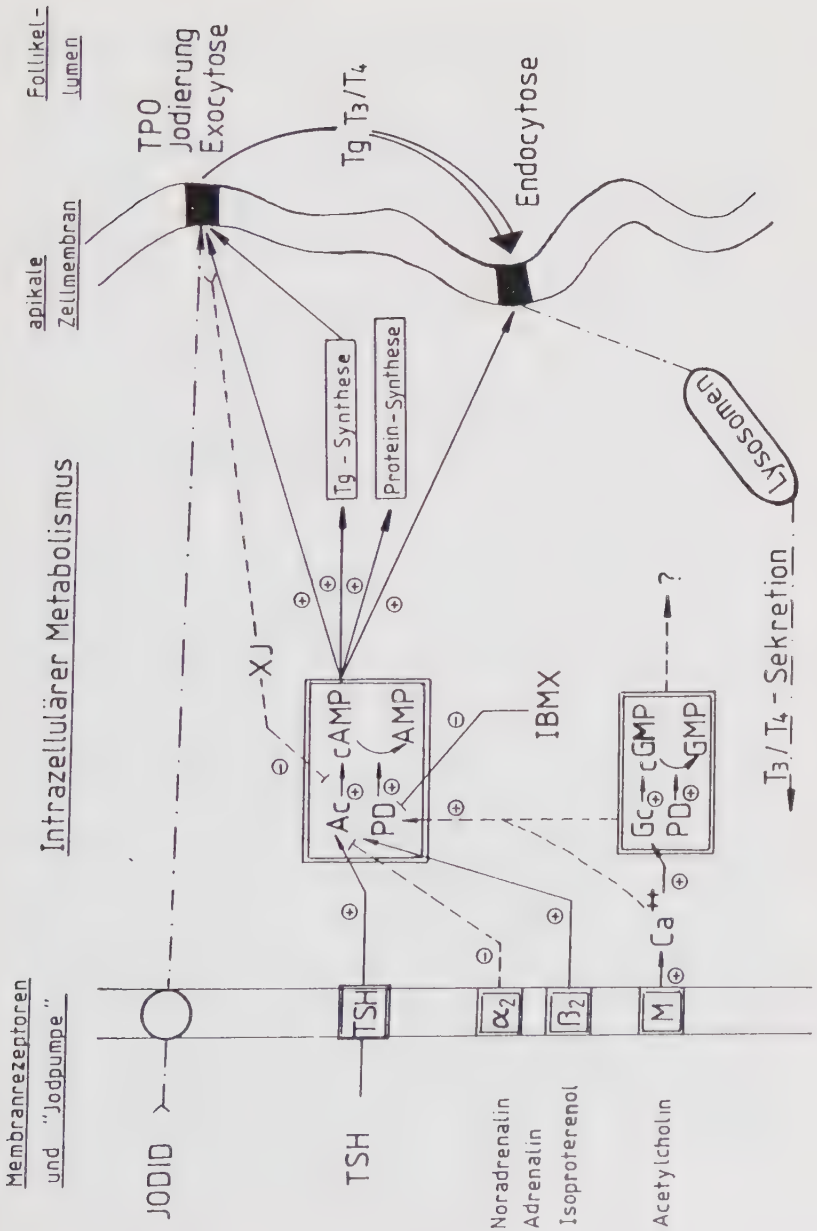
Abbildung 24: Schematische Darstellung des intrazellulären Metabolismus der Regulationswege der Schilddrüse, die an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität untersucht wurden.

Es handelt sich um Ergebnisse aus der Literatur. Etablierte, vielfach experimentell überprüfte und auch für die menschliche Schilddrüse akzeptierte Vorstellungen sind mit durchgezogenen Pfeilen (—▶) dargestellt, Hypothesen, die kontrovers in der Literatur diskutiert werden, mit gestrichelten Pfeilen (----▶).

Ähnliche und detailliertere Schemata finden sich bei DUMONT et al. (11, 13, 14).

(+)	Stimulation (—▶ ----▶)
(-)	Inhibierung (— ----)
Ac	Adenylatcyclase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Gc	Guanylatcyclase
cGMP	cyclisches Guanosin-3', 5'-monophosphat
PD	Phosphodiesterasen
M	muscarinerger Rezeptor
TPO	thyreoidale Peroxidase
XJ	postuliertes oxidatives Jodderivat

(DUMONT et al. 1981)



Allgemeine Einführung in die Regulation des Schilddrüsenstoffwechsels

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse an den isolierten Follikeln wird im folgenden Abschnitt kurz anhand eines Schemas der intrazelluläre Metabolismus dargestellt, der den untersuchten Regulationswegen der Schilddrüse zugrundeliegt (Abb. 24).

Zum Teil handelt es sich dabei um etablierte, vielfach experimentell überprüfte und auch für die menschliche Schilddrüse akzeptierte Vorstellungen (durchgezogene Pfeile), zum Teil um Hypothesen, die kontrovers in der Literatur diskutiert werden (gestrichelte Pfeile). Ähnliche und detailliertere Schemata finden sich bei DUMONT et al. (11, 13, 14).

Ein Großteil der Funktionen der Schilddrüse wird über die Aktivierung des Adenylatcyclase-Systems durch TSH und somit über die Bildung des "second-messenger" cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) reguliert. cAMP seinerseits steuert den Zellstoffwechsel durch die Aktivierung cAMP-abhängiger Proteinkinasen und wird durch spezifische Phosphodiesterasen abgebaut.

Die Proteinkinasen aktivieren oder hemmen zelluläre Proteine durch Phosphorylierung und rufen so die hormonalen Effekte hervor, wie die Steigerung der Proteinsynthese, speziell auch der Thyreoglobulin-Synthese, die Zunahme der Jodierung von Thyreoglobulin und die vermehrte Freisetzung von Schilddrüsenhormonen.

Neben dem cAMP-System gibt es noch weitere intrazelluläre Regulationssysteme, von denen hier nur das Ca^{++} -cGMP-System dargestellt ist.

Die beiden physiologischen Hauptregulatoren aller Schilddrüsen sind TSH und Jodid, wobei TSH die Schilddrüse aktiviert und Jodid die Wirkung von TSH inhibiert (11).

Während TSH also stimulierend auf die Bildung von cAMP wirkt, hemmt die Zufuhr von Jodid diesen TSH-Effekt am cAMP-System (10). Einige Autoren postulieren eine lösliche organische Jodverbindung (XJ), die inhibierend direkt an der Adenylatcyclase angreift, da die Wirkung der Jodid-Zufuhr durch Propylthiouracil oder Methimazol aufgehoben werden konnte (10,13).

Es gibt eine Vielzahl weiterer Substanzen, die eine positive oder negative Kontrolle auf die Regulationssysteme der Schilddrüse ausüben.

Allerdings fanden sich dabei größere speziesspezifische Unterschiede in der Wirkung. Die physiologische Bedeutung dieser Substanzen bei der Regulation der Schilddrüsenfunktion ist noch ungeklärt (11).

Die Katecholamine zum Beispiel wirken über eigene, von den TSH-Rezeptoren verschiedene β -adrenerge Rezeptoren stimulierend auf das cAMP-System der Schilddrüse (35, 50, 52). In menschlichen Schilddrüsenzellen in Kultur konnte eine aktivierende Wirkung der Katecholamine vorwiegend über β_2 -Rezeptoren nachgewiesen werden (52).

Die Katecholamine zählen auch zu den negativen Kontrollen des cAMP-Systems in der Schilddrüse und üben ihren hemmenden Effekt dabei hauptsächlich über α_2 -Rezeptoren aus (41).

Ebenfalls inhibierend wirkt Acetylcholin auf die cAMP-Bildung. Es greift jedoch primär am Ca^{++} -cGMP-System der Schilddrüse an (12). Acetylcholin führt über muscarinerge Rezeptoren zu einem Ca^{++} -Einstrom in die Zellen. Man vermutet, daß dadurch entweder direkt, oder über eine zwischengeschaltete Erhöhung der cGMP-Konzentration, eine der verschiedenen Phosphodiesterasen der Schilddrüsenzelle aktiviert wird, wodurch dann der cAMP-Spiegel absinkt.

Eine dominierende Stellung in der Schilddrüsenzelle nimmt der Jodstoffwechsel ein.

Der Transport von Jodid wird durch TSH biphasisch beeinflusst (21, 51, 57, 59). Zuerst führt TSH zu einem vermehrten Jod-Efflux aus den Thyreozyten. Dabei nimmt man eine verstärkte Membranpermeabilität für Jodid, induziert durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration an (58). Den Jodidtransport in die Zellen steigert TSH erst nach Stunden in einer Langzeitwirkung. Der genaue Mechanismus der "Jodpumpe" und ihrer Regulation sind erst teilweise aufgeklärt (56 - 58).

Die Steigerung des Jodeinbaus in Proteine, speziell das Thyreoglobulin, wird über den "second-messenger" cAMP vermittelt (13, 14, 27) und ist mit TSH innerhalb kurzer Zeit stimulierbar (1, 30).

Auch die Sekretion der Schilddrüsenhormone wird durch TSH über den "second-messenger" cAMP stimuliert (8). Zuerst muß das Kolloid durch Endocytose an der apikalen Zellmembran wieder in die Thyreozyten aufgenommen werden. Die endocytotischen Vesikel verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen die Proteolyse des Thyreoglobulins stattfindet. Abschließend werden die Schilddrüsenhormone an der basolateralen Seite der Thyreozyten freigesetzt. Wie die Schilddrüsenhormone von den Follikelzellen abgegeben werden, ist nicht geklärt. Man nimmt eine Diffusion von den sekundären Lysosomen in das Zytoplasma an und einen Transport mit Hilfe von Mikrotubuli und Mikrofilamenten in den Extrazellulärraum, aber auch ein exocytotischer Prozess ist nicht ausgeschlossen (8).

Zum Abschluß dieser kurzen Einführung in die Regulation des Schilddrüsenstoffwechsels zeigt der Vorgang der Schilddrüsenhormon-Sekretion nochmals besonders eindrucklich, wie sehr die polare Struktur des Schilddrüsenfollikels Voraussetzung für seine ungestörte Funktion ist.

Funktionelle Charakterisierung des entwickelten in-vitro-Modells

In den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität wurde die Bildung des "second-messenger" cAMP unter dem stimulierenden Einfluß von TSH und dem inhibierenden Einfluß von Jodid untersucht.

Als Vertreter jeweils einer weiteren positiven beziehungsweise negativen Kontrollsubstanz, deren physiologische Bedeutung in der Regulation der Schilddrüse jedoch noch ungeklärt ist, wurden die Katecholamine, speziell das Isoproterenol und das Acetylcholin bei der funktionellen Untersuchung der isolierten Follikel eingesetzt.

Außerdem wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von Jodid an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität überprüft, sowie die Organifizierung des Jodids, also der Einbau des Jodids in Proteine, und die Freisetzung von Thyroxin ins Kulturmedium.

In den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität war die Fähigkeit zur Aufnahme von Jodid erhalten. Die Aufnahme des Jodids in isolierte Follikel in Medium mit und ohne Zusatz von 1 % FKS erreichte nach etwa vier Stunden ein steady state.

In der Literatur wird das Erreichen eines steady state der Jodidaufnahme in weniger als einer Stunde angegeben, allerdings bei Blockierung der Organifizierung des Jodids mit Propylthiouracil (30) beziehungsweise bei der Untersuchung von kultivierten Thyreozyten, die kaum noch Jodid organifizieren können (56).

In unseren Untersuchungen wurde die Organifizierung des Jodids nicht gehemmt, sodaß die Ergebnisse nur eine Netto-Aufnahme anzeigen, also das Resultat des gesamten Jodstoffwechsels mit Aufnahme und -abgabe von Jodid, Jodierung und Dejodierung von Proteinen.

Die Aufnahme des Jodids konnte durch 1 mU/ml bTSH nicht signifikant beschleunigt werden. Die Follikel hatten mit TSH nach 10 Minuten ca. 1,2 pMol KJ/ μ g DNA gespeichert, während Follikel ohne TSH zu diesem Zeitpunkt ca. 0,9 pMol KJ/ μ g DNA aufgenommen hatten. Nach 30 Minuten Inkubation blieb die aufgenommene Jodidmenge in den Follikeln mit TSH konstant bei ca. 1,2 pMol KJ/ μ g DNA, während die Follikel ohne TSH jetzt eine größere Menge Jodid von ca. 1,6 pMol KJ/ μ g DNA angereichert hatten.

Die meisten anderen, in der Literatur beschriebenen Versuche zum Einfluß von TSH auf die Jodidaufnahme erstrecken sich über wesentlich längere Inkubationszeiten (21, 57, 59). Bei den wenigen Versuchen anderer Arbeitsgruppen mit kurzen Inkubationszeiten sind die Angaben über die Wirkung von TSH auf die Jodidaufnahme kontrovers. So gibt es Autoren, die eine nicht signifikante Steigerung der Jodidaufnahme nach 30 Minuten unter TSH (50 mU/ml) beschreiben (1), aber auch Autoren, die nach 30 Minuten eine deutlich geringere Jodidaufnahme mit TSH (2 mU/ml) im Vergleich zur Kontrolle ohne TSH fanden und eine Stimulation des Jod-Effluxes mit TSH vermuteten (30).

Die Jodidaufnahme in die isolierten Follikel mit TSH war nach 30 Minuten auch bei unserem Versuch niedriger als die Jodidaufnahme in die Follikel ohne TSH.

Da wir in unseren Versuchen die Organifizierung von Jodid bei der Messung der Jodidaufnahme nicht gehemmt hatten, ist nicht nur eine Stimulation des Jod-Effluxes mit TSH denkbar, sondern auch eine Beschleunigung des gesamten Jodstoffwechsels durch das TSH. Das Jodid wird dabei unter dem Einfluß von TSH auch wieder als Schilddrüsenhormon aus den Follikeln ins Medium freigesetzt. Dieser Prozess könnte die dann nur scheinbar verringerte Jodidaufnahme durchaus erklären.

Ein grundsätzliches Problem bei der Untersuchung der Wirkung von TSH auf die Jodidaufnahme scheint also die Trennung in Versuche mit und ohne Blockierung der Organifizierung zu sein. Außerdem wäre eine bessere Standardisierung des Ausgangszustandes des Gewebes bezüglich seiner Jodsättigung beziehungsweise seines Jodmangels sicher aufschlußreich.

An den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität wurde zwar der Einfluß des TSH auf die Jodidaufnahme noch nicht eindeutig charakterisiert, die grundsätzliche Fähigkeit der Follikel zur raschen Jodidaufnahme konnte jedoch gezeigt werden.

Die isolierten Follikel mit erhaltener Polarität bauten das aufgenommene Jodid in Proteine ein. Diese Organifizierung des Jodids war in Übereinstimmung mit der Literatur rasch mit TSH stimulierbar (1, 30).

Nach zehn Minuten waren 66 % des aufgenommenen Jodids in den Follikeln mit 1 mU/ml bTSH organisiert, gegenüber 30 % in den Follikeln ohne TSH.

Nach 30 Minuten blieb der Anteil des organifizierten Jods in den Follikeln mit TSH in etwa konstant bei 63 %, stieg also nicht weiter an. Dagegen erhöhte er sich in den Follikeln ohne TSH auf 40 %.

Der Ablauf unter TSH läßt sich durch die Stimulation der Schilddrüsenhormon-Sekretion mit TSH erklären. Es ist daher ein steigender Anteil an organifiziertem Jod im Medium zu erwarten, der aber je nach Zeitdauer des Versuchs, Zellmengen und Verteilungsvolumen absolut betrachtet sehr niedrig liegen kann. So gelang es uns bis jetzt auch noch nicht, diesen von uns vermuteten Anstieg des organifizierten Jods im Medium nachzuweisen.

Die Untersuchung der Aufnahme und Organifizierung von Jodid nach Zugabe von Isoproterenol (100 nM) unter den gleichen Bedingungen wie bei den Versuchen mit bTSH (1 mU/ml), also mit 10 und 30 Minuten-Werten, ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Da Isoproterenol über β -adrenerge Rezeptoren die Bildung von cAMP stimuliert, und dieses als "second-messenger" die Organifizierung von Jodid steigert (13), ist das Ausbleiben eines positiven Isoproterenol-Effekts auf die Organifizierung des Jodids in unseren Versuchen unerwartet. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet die verwendete sehr niedrige Isoproterenol-Konzentration von 100 nM. Bei dieser Konzentration war die Stimulation der cAMP-Bildung gerade nachweisbar.

Sie führte aber nur zu einem weitaus geringeren Anstieg des cAMP-Spiegels in den isolierten Follikeln, als die Zugabe von 1 mU/ml bTSH.

Isolierte Follikel mit erhaltener Polarität sezernierten bereits ohne TSH geringe Mengen Thyroxin ins Medium.

Die Schilddrüsenhormon-Sekretion der isolierten Follikel war in Übereinstimmung mit der Literatur mit TSH deutlich stimulierbar (8).

Während einer Inkubationszeit von 14 Stunden mit 1 mU/ml beziehungsweise 100 mU/ml bTSH setzten sie 40 ng T_4 pro Schale ($\hat{=}$ ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen) frei, achtmal mehr als die Follikel ohne TSH.

Mit der Messung der cAMP-Spiegel in isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität unter dem Einfluß verschiedener Kontrollsubstanzen konnte die Intaktheit der beiden beschriebenen intrazellulären Regulationssysteme der Schilddrüse, des cAMP- und des Ca^{++} -cGMP-Systems, nachgewiesen werden.

Ein Teil der Versuche wurde dabei ohne Hemmung der Phosphodiesterasen und ein Teil mit dem Phosphodiesterase-Hemstoff 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) in einer Konzentration von 0,5 mM oder 1 mM im Inkubationsmedium durchgeführt. Auf die Problematik der Verwendung von Phosphodiesterase-Hemmern möchte ich nach der Darstellung der Ergebnisse der cAMP-Messungen an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität eingehen.

In einer Kurzzeitkinetik mit 0,5 mM IBMX zeigten die isolierten Follikel in Übereinstimmung mit der Literatur (20, 27, 46, 49) bereits 30 Sekunden nach Zugabe von 1 mU/ml bTSH einen raschen Anstieg des cAMP-Spiegels, erreichten ein Plateau zwischen zwei und fünf Minuten und waren nach zehn Minuten wieder um ca. 27 % des Maximalwerts der cAMP-Konzentration abgefallen.

In Kurzzeit- (bis fünf Minuten) und Langzeitversuchen (bis 45 Minuten) ohne Hemmung der Phosphodiesterasen war der cAMP-Anstieg in den Zellen der isolierten Follikel mit erhaltener Polarität erwartungsgemäß wesentlich niedriger (vgl. 20). Dies ist auf den gleichzeitig unbeeinflußt weiterlaufenden Abbau des cAMP durch die Phosphodiesterasen zurückzuführen. Erst fünf Minuten nach Stimulation mit 1 mU/ml bTSH stiegen die cAMP-Spiegel in den Follikeln ohne IBMX von 0,35 pMol cAMP/ μ g DNA auf 0,6 pMol cAMP/ μ g DNA an, also um etwa 80 % des Kontrollwerts. Im Vergleich dazu betrug der cAMP-Anstieg in den Follikeln mit 0,5 mM IBMX nach fünf Minuten rund 300 % der Kontrolle, die bei 0,3 pMol cAMP/ μ g DNA lag. Der maximale cAMP-Wert in den Follikeln mit 0,5 mM IBMX wurde bereits nach zwei Minuten mit 1,23 pMol cAMP/ μ g DNA gemessen.

Im Dosis-Wirkungs-Versuch mit TSH sprachen die isolierten Follikel mit erhaltener Polarität schon auf die relativ niedrige TSH-Dosis von 100 μ U/ml (vgl. 27) mit einem Anstieg des cAMP-Spiegels um ca. 200 % gegenüber der

Kontrolle an, obwohl bei allen Versuchen mit den Schweine-schilddrüsenfollikeln ein schwach gereinigtes bovines TSH benutzt wurde. Bei Konzentrationen von 1,0 mU/ml bTSH und 100 mU/ml bTSH betrugen die cAMP-Werte das 16- beziehungsweise 32-fache des Kontrollwerts ohne TSH.

Als weitere Substanz mit einer positiven Wirkung am cAMP-System wurde das Isoproterenol an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität eingesetzt. Isoproterenol stimuliert über β -adrenerge Rezeptoren die cAMP-Bildung in den Schilddrüsen verschiedener Spezies (37, 50).

In einer Kurzzeitkinetik mit 0,5 mM IBMX zeigte die cAMP-Bildung in den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität nach Zugabe von 1 μ M Isoproterenol in Übereinstimmung mit der Literatur (2, 20, 35, 50) einen anderen zeitlichen Ablauf, als nach Zugabe von 1 mU/ml bTSH.

Mit 1 μ M Isoproterenol war das Maximum des cAMP-Konzentrationsanstiegs bereits nach einer Minute erreicht. Danach folgte sofort ein rascher Abfall des cAMP-Spiegels, ohne ein Plateau wie nach TSH-Zugabe, sodaß der stimulierende Effekt des Isoproterenol bereits nach etwa zehn Minuten beendet war.

Es läßt sich vermuten, daß die unterschiedliche Kinetik des "second-messenger" cAMP bei Stimulation mit TSH oder Katecholaminen auch unterschiedliche Auswirkungen auf die Regulation der nachgeschalteten intrazellulären Stoffwechselwege hat.

Im Dosis-Wirkungs-Versuch zeigten die Follikel mit erhaltener Polarität bereits bei einer Konzentration von 0,1 μ M Isoproterenol nach zwei Minuten einen Anstieg des cAMP-Spiegels gegenüber der Kontrolle um ca. 35 % und eine dosisabhängige Steigerung dieses Anstiegs, bis auf ca. 150 % bei einer Konzentration von 100 μ M Isoproterenol. Der Effekt von Isoproterenol (1 μ M) konnte mit dem β -Blocker DL-Propranolol (10 μ M) gehemmt werden.

Adrenalin und Noradrenalin, jeweils in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$, erbrachten nur geringfügige cAMP-Konzentrationsanstiege nach zwei Minuten, entsprechend der Wirkung von $0,1 \mu\text{M}$ Isoproterenol.

Dieser starke Unterschied in der stimulierenden Wirkung der drei Katecholamine läßt sich durch das Zusammenspiel von Stimulation des Adenylatcyclase-Systems über β -adrenerge Rezeptoren und Hemmung über α -adrenerge Rezeptoren erklären.

Dabei scheint in verschiedenen in-vitro-Modellen der Schilddrüse ein unterschiedliches Gleichgewicht der stimulierenden β -adrenergen und hemmenden α -adrenergen Einflüsse auf die cAMP-Bildung zu bestehen (48, 52). Es läßt sich vermuten, daß neben Spezies - Verschiedenheiten in der Rezeptorendichte auch die Höhe der Basalaktivität von unterschiedlich präpariertem Schilddrüsen Gewebe eine Rolle spielt, sowie der Einfluß nicht-thyreoidaler Zellen in Schilddrüsen Schnitten (48) und -lappen (35).

Die negative Regulation der Schilddrüse wurde am Einfluß der Jodid-Zufuhr auf die cAMP-Bildung an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur (49, 54) zeigten Follikel, die 20 Stunden in einem Medium mit $1 \mu\text{M}$ KJ vorinkubiert worden waren, zwei Stunden nach Stimulation mit bTSH (10 mU/ml) über 60 % niedrigere cAMP-Spiegel, als die Kontrolle ohne Jodid im Vorinkubationsmedium.

Die Konzentration von $1 \mu\text{M}$ KJ war im Vergleich zu den von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten Konzentrationen relativ gering ($100 \mu\text{M}$ bei VAN SANDE et al. (54), $10 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ bei SHERWIN et al. (49)).

Als weitere Substanz mit inhibierender Wirkung auf die cAMP-Bildung, allerdings, wie bereits beschrieben, mit einem primären Angriff am Ca^{++} -cGMP-System, wurde Acetylcholin an den Follikeln mit erhaltener Polarität untersucht.

Übereinstimmend mit der Literatur (60) ergab Acetylcholin allein keinen signifikanten Unterschied des cAMP-Spiegels gegenüber der Kontrolle.

Dagegen konnte der Anstieg der cAMP-Konzentration auf 1 mU/ml bTSH in den Follikeln mit erhaltener Polarität durch die gleichzeitige Zugabe von 10 μM Acetylcholin vollständig unterdrückt werden (vgl. 10, 12, 13). Da Acetylcholin vermutlich den cAMP-Abbau durch Aktivierung der Phosphodiesterasen steigert (12) und daher Phosphodiesterase-Hemmstoffe den Acetylcholin-Effekt blockieren (10, 13), wurde der Versuch ohne IBMX durchgeführt.

Problematik der Verwendung von Phosphodiesterase-Blockern

Phosphodiesterase-Hemmstoffe werden eingesetzt, um die Messung des "second-messenger" cAMP, der relativ schnell durch die Phosphodiesterasen wieder abgebaut wird, zu erleichtern oder teilweise überhaupt erst zu ermöglichen. Ein Beispiel dafür geben die cAMP-Messungen nach Stimulation isolierter Follikel mit Isoproterenol. In Versuchen mit Isoproterenol ohne IBMX (nicht gezeigte Ergebnisse) konnten entweder nur sehr geringfügige oder häufig auch gar keine cAMP-Anstiege gemessen werden. Dagegen war der Effekt des Isoproterenol in den Versuchen mit 0,5 mM IBMX deutlich zu sehen.

Die Eigenaktivität der Phosphodiesterase-Hemmstoffe kann zumindest in niedrigen Konzentrationen vernachlässigt

werden. Das bestätigten auch die vergleichenden Kontrollmessungen bei isolierten Follikeln mit und ohne 0,5 mM IBMX.

Allerdings können durch die Verwendung von Phosphodiesterase-Hemmstoffen durchaus auch Wirkungen von Substanzen an den Regulationssystemen von Zellen verdeckt werden, wie das Beispiel von Acetylcholin an der Schilddrüsenzelle zeigt. Da Acetylcholin vermutlich durch eine Aktivierung der Phosphodiesterasen den cAMP-Abbau steigert (12), wird sein Effekt durch Phosphodiesterase-Blocker unterdrückt (10, 13).

Die Unterschiede bei den Versuchen mit und ohne Phosphodiesterase-Hemmstoff werden an den Extrem-Beispielen des Langzeitversuchs mit der höheren Konzentration von 1 mM IBMX, verglichen mit dem Kurzzeitversuch ohne IBMX an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität besonders deutlich.

Bei dem Langzeitversuch mit 1 mM IBMX und Stimulation mit 1 mU/ml bTSH fand sich nach vier Stunden ein cAMP-Konzentrationsanstieg auf 47 pMol cAMP/ μ g DNA, bei einem Kontrollwert unter 1 pMol cAMP/ μ g DNA. Verglichen mit dem cAMP-Anstieg bei dem Kurzzeitversuch (5-Minuten-Wert) ohne IBMX ebenfalls mit 1 mU/ml bTSH lag der Wert des Langzeitversuchs fast 80fach höher. Dabei wurde der Wert erst vier Stunden nach TSH-Zugabe gemessen, zu einem Zeitpunkt, bei dem bei einer niedrigen IBMX-Konzentration oder einem Versuch ohne IBMX nur noch ein cAMP-Wert im Kontrollbereich zu erwarten ist. Außerdem fand sich der Hauptanteil dieser cAMP-Mengen im Unterschied zu den Kurzzeitversuchen nicht intrazellulär, sondern im Medium.

Es kommt bei einer vollständigen Blockierung des cAMP-Abbaus durch die Phosphodiesterasen und einer starken Stimulation der cAMP-Synthese mit TSH innerhalb von Stunden

zu einem Austritt von cAMP aus den Zellen. Dieser Vorgang scheint sowohl von der Zeit abhängig zu sein, als auch von der Höhe der cAMP-Spiegel.

BIDEY et al. untersuchten das Phänomen des cAMP-Austritts aus den Zellen an Monolayer-Kulturen normaler menschlicher Schilddrüsenzellen und vermuteten, daß es sich hierbei um einen aktiven Transport handeln könnte (3). Sie kamen zu dem Ergebnis, daß bei langen Inkubationszeiten (16 h) der Spiegel an extrazellulärem cAMP ein genaues Maß für die Stimulierbarkeit von Schilddrüsenzellen ist.

Dagegen waren auch bei BIDEY et al. bei kürzeren Inkubationszeiten (1 h) die intrazellulären cAMP-Spiegel allein maßgebend, da nach 1 h Inkubation mit TSH-Dosen unter 1 mU/ml überhaupt kein cAMP im Medium meßbar war. Alle Versuche der Autoren wurden in Medium mit 0,5 mM IBMX durchgeführt.

Versuche ohne Hemmung der Phosphodiesterasen bedeuten eine bessere Annäherung an physiologische Verhältnisse. Das wird durch das Phänomen des cAMP-Austritts aus den Zellen bei der Blockierung des cAMP-Abbaus bestätigt. Jedoch ist ein Versuchsansatz ohne Phosphodiesterase-Hemmer wesentlich störanfälliger, da die cAMP-Spiegel auch unter Stimulation nur relativ gering ansteigen infolge des ungehindert weiterlaufenden cAMP-Abbaus.

Für die Testung von Substanzen, wie TSI (Thyreoidea stimulierende Immunglobuline), deren stimulierender Effekt auf die Schilddrüse nachgewiesen werden soll, ist ein Versuchsansatz ohne Hemmung der Phosphodiesterasen daher denkbar ungünstig (vgl. 3).

In einem Modellsystem der Schilddrüse in vitro, wie den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität, stellt der Versuchsansatz der Stimulation mit TSH ohne IBMX jedoch einen zusätzlichen empfindlichen Indikator für den Nachweis der intakten Hormon-Rezeptor-Kopplung dar.

Lokalisation von Hormonrezeptoren und der "Jodpumpe" im Schilddrüsenfollikel

Ausgehend von der fundamentalen Bedeutung der Polarität für die normale Funktion eines Schilddrüsenfollikels interessierte uns besonders die Verteilung der Hormonrezeptoren und die Lokalisation der "Jodpumpe" auf der apikalen und/oder basolateralen Seite der Zellmembran der Thyreozyten. Unser Konzept war eine Lokalisation der Hormonrezeptoren und der "Jodpumpe" nur an der basolateralen Zellmembran, also auch hier eine polare Anordnung.

Zur Beantwortung der Frage der Rezeptor-Verteilung und der Lokalisation der "Jodpumpe" führten wir einen Vergleich der funktionellen Eigenschaften von Follikeln mit erhaltener und mit umgekehrter Polarität durch, das heißt einen Vergleich der zellulären Antwort der Thyreozyten bei einem Reiz auf ihrer basolateralen oder ihrer apikalen Seite.

Wir untersuchten dazu an Follikeln mit umgekehrter Polarität, die wir nach der Methode von HERZOG und MILLER (24, 25) präparierten, die Stimulierbarkeit der cAMP-Bildung, die Aufnahme von Jodid und die T_4 -Freisetzung im Vergleich zu den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität.

Die Follikel mit umgekehrter Polarität zeigten auch mit einer hohen Dosis bTSH (100 mU/ml) nur einen geringen Anstieg der cAMP-Konzentration verglichen mit den Follikeln mit erhaltener Polarität.

In Versuchen mit kurzen Inkubationszeiten, bis zu zehn Minuten, und Stimulation mit bTSH und in Versuchen mit Katecholaminen wurde bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität kein Anstieg der cAMP-Spiegel gefunden.

Follikel mit umgekehrter Polarität nahmen im Gegensatz zu den Follikeln mit erhaltener Polarität kein Jodid auf. Auch nach Stimulation mit 100 mU/ml bTSH setzten die Follikel mit umgekehrter Polarität kaum Schilddrüsenhormon ins Medium frei. Erst nach Zugabe von Thyreoglobulin vom Schwein zum Inkubationsmedium konnten bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität unter Stimulation mit bTSH vergleichbare Mengen an T_4 im Medium gefunden werden, wie bei den Follikeln mit erhaltener Polarität.

Da die Schilddrüsenhormon-Sekretion an die endocytotische Aufnahme von Kolloid an der apikalen Zellmembran der Thyreozyten gebunden ist, konnten die Follikel mit umgekehrter Polarität kein Hormon freisetzen. Erst durch die Zugabe von Thyreoglobulin zum Medium, also durch die Zufuhr von Kolloid auf der apikalen Seite der Zellmembran, konnte auch bei den "inside-out"-Follikeln eine Schilddrüsenhormon-Sekretion erreicht werden.

Bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität erwartet man jedoch konsequenterweise kein T_4 im Medium, sondern nur im Lumen, das von der basolateralen Zellmembran umschlossen wird und somit dem Medium bei den Follikeln mit erhaltener Polarität entspricht. Die Freisetzung von T_4 ins Kulturmedium, und nicht ins Lumen der Follikel mit umgekehrter Polarität, läßt sich entweder durch Diffusion (25) oder durch einen transepithelialen, vesikulären Transport-Prozeß (= Transcytose, vgl. 26) erklären.

In der Literatur wird das Thema der Rezeptor-Lokalisation kontrovers diskutiert.

HERZOG und MILLER (25) vermuteten auf Grund der einfachen Tatsache der Stimulierbarkeit ihrer "inside-out"-Follikel mit TSH, daß die TSH-Rezeptoren auch an der apikalen Zellmembran zu finden seien.

MIZUKAMI et al. untersuchten die Lokalisation der Adenylatcyclase-Aktivität mit histochemischen Methoden unter dem Licht- und Elektronenmikroskop (40). Sie benutzten Adenylyl-imidodiphosphat (AMP-PNP) als Substrat für die Adenylatcyclase und fanden geringe Mengen ihres Reaktionsproduktes in normalem menschlichem Schilddrüsengewebe nur an der lateralen Zellmembran, und in einem autonomen Adenom nur an der apikalen und lateralen Zellmembran. Das Fehlen nachweisbarer Adenylatcyclase-Aktivität an der basalen Zellmembran, ließ sie vermuten, daß TSH eventuell erst durch Diffusion in die interzellulären Räume und das Follikellumen zu seinen Rezeptoren gelangt.

Neuere Untersuchungen von CHAMBARD et al. über die Jodaufnahme und die Stimulierbarkeit von Schilddrüsenzellen in Monolayer-Kultur mit TSH wiesen dagegen auf eine Lokalisation der "Jodpumpe" und des TSH-Rezeptor-Adenylatcyclase-Komplexes an der basolateralen Seite der Zellmembran hin (6). In ihren Versuchen kultivierten sie Thyreozyten in Schalen, deren Boden mit einem Kollagengel bedeckt war. Die Zellen bildeten polarisierte Monolayer, wobei der basale Pol der Zellen an dem Kollagengel haftete und die apikale Seite der Zellen zum Kulturmedium zeigte. Solange nur die apikale Zellmembran zugänglich war, nahmen die Zellen weder Jodid auf, noch ließen sie sich akut mit TSH stimulieren. Sobald aber das Gel vom Boden der Kulturschalen abgelöst wurde und somit der basale Teil der Zellmembran wieder Kontakt zum Medium hatte, waren sowohl die Jodidaufnahme, als auch die Ansprechbarkeit auf TSH wiederhergestellt.

Dasselbe Phänomen zeigte unser Vergleich der Follikel mit erhaltener und umgekehrter Polarität. Nur die Follikel mit erhaltener Polarität und freiem Zugang zur basolateralen Zellmembran waren in der Lage Jodid aufzunehmen und

reagierten bei der Stimulation mit TSH und Katecholaminen sofort mit einer vermehrten cAMP-Bildung. Die Follikel mit umgekehrter Polarität, deren apikale Zellmembran zum Medium schaut, nahmen kein Jodid auf und reagierten nur sehr schwach auf eine Stimulation der cAMP-Bildung mit TSH. Man kann daher entweder annehmen, daß das TSH erst durch Diffusion oder durch einen transepithelialen, vesikulären Transport-Prozeß (= Transcytose, vgl. 26) zu den Rezeptoren an der basolateralen Zellmembran gelangen muß, oder daß die geringe cAMP-Bildung durch eine Stimulation von Follikelsegmenten mit einer frei zugänglichen basolateralen Zellmembran in der Suspension zustande kommt. Aus diesem unterschiedlichen funktionellen Verhalten der Follikel mit umgekehrter und erhaltener Polarität läßt sich in Übereinstimmung mit CHAMBARD et al. (6) schließen, daß sowohl die TSH- und β -adrenergen Rezeptoren, als auch die "Jodpumpe" ausschließlich im basolateralen Teil der Zellmembran lokalisiert sind.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß es für die Untersuchung der Funktion der Schilddrüse von entscheidender Bedeutung ist, Follikel mit erhaltener Polarität in Kultur zu gewinnen.

In Follikeln mit umgekehrter Polarität ist nur die apikale Seite der Zellmembran zugänglich, weshalb sie sich besonders als in-vitro-Modell für die genaue Untersuchung von Endocytosevorgängen eignen (24, 26).

In Monolayer-Kulturen von Schilddrüsenzellen geht die Polarität der Thyreozyten entweder ganz verloren (42) oder es bilden sich die von CHAMBARD et al. (6) beschriebenen polaren Monolayer, bei denen primär nur die apikale Seite der Zellen zugänglich ist. Andere, spezielle Monolayer-Kulturen, wie zum Beispiel die FRTL-5 Zellen aus Rattenschilddrüsen, sind offenbar nicht polare Zellklone TSH-ab-

hängiger Thyreozyten, die Jodid aufnehmen und Thyreoglobulin synthetisieren können und auch bei der Untersuchung des Wachstums der Schilddrüse eingesetzt werden (53).

Die isolierten Follikel mit erhaltener Polarität sind dagegen ein in-vitro-Modell der intakten Schilddrüse. Nur die basolaterale Zellmembran der Thyreozyten mit den Hormonrezeptoren und der "Jodpumpe" ist bei den isolierten Follikeln frei zugänglich. Als kleinste funktionelle Untereinheiten der Schilddrüse in Kultur ermöglichen sie sowohl eine Untersuchung der Regulation differenzierter Stoffwechselleistungen, als auch eine Erforschung der Regulation des Wachstums der Thyreozyten, die dabei, wie in vivo, in ihrem funktionellen Verband bleiben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode zur Präparation von Follikeln mit erhaltener Polarität aus Schweineschilddrüsen entwickelt. Intakte Follikel wurden durch die Injektion von Kollagenaselösung in die Arterie der Schweineschilddrüse und die anschließende Inkubation der ganzen Drüse schonend aus dem Gewebe gelöst. Die isolierten Follikel wurden durch Waschen und Sedimentieren und das Herauslesen großer Bindegewebssteile und Aggregate von Hand aus der Follikelsuspension gereinigt. Dadurch wurde eine mechanische Verletzung der Follikel bei der Präparation soweit als möglich vermieden. Außerdem konnten auf diese Weise Teile der extrazellulären Matrix, Basalmembranreste und Grundsubstanz, in der Follikelsuspension erhalten werden. Mit dieser Methode erhielten wir ca. 80 % Follikel mit erhaltener Polarität. Diese "right-side-right"-Follikel änderten bei einer Kulturzeit von sechs Tagen weder in Medium mit 1 % noch mit 5 % FKS ihre Polarität. Die atraumatische Präparationsmethode mit der Erhaltung von Anteilen der bindegewebigen extrazellulären Matrix ermöglichte die Isolierung und Kultur morphologisch intakter, stabiler Follikel mit erhaltener Polarität.

Die funktionellen Untersuchungen an den isolierten Follikeln mit erhaltener Polarität ergaben einen raschen, empfindlichen und dosisabhängigen Anstieg der Konzentration des "second-messenger" cAMP auf TSH. Auch mit Isoproterenol konnte die cAMP-Bildung in den isolierten Follikeln über β -adrenerge Rezeptoren dosisabhängig stimuliert werden. Der TSH-induzierte cAMP-Anstieg konnte mit Jodid und mit Acetylcholin inhibiert werden. Die isolierten Follikel

mit erhaltener Polarität nahmen Jodid auf und bauten es in Proteine ein. Die Organifizierung des Jodids war ebenso wie die Freisetzung von Thyroxin mit TSH stimulierbar.

Im Gegensatz dazu zeigten Follikel mit umgekehrter Polarität, die mit der Präparationsmethode von HERZOG und MILLER (24, 25) gewonnen wurden, auch auf eine hohe TSH-Dosis nur einen geringen cAMP-Anstieg. In Kurzzeitversuchen mit TSH und in Versuchen mit Katecholaminen konnte bei den Follikeln mit umgekehrter Polarität kein cAMP-Anstieg gefunden werden.

Die Follikel mit umgekehrter Polarität nahmen kein Jodid auf und konnten erst nach Zugabe von Thyreoglobulin zum Inkubationsmedium unter Stimulation mit TSH Thyroxin freisetzen.

Diese unterschiedlichen funktionellen Charakteristika der Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener und mit umgekehrter Polarität führen zu dem Schluß, daß sowohl die "Jodpumpe", als auch die TSH- und β -adrenergen Rezeptoren ausschließlich auf der basolateralen Seite der Zellmembran lokalisiert sind.

Die funktionelle Untersuchung der isolierten Schweineschilddrüsenfollikel mit erhaltener Polarität ergab das Bild intakter und selbständig funktionierender Untereinheiten der Schilddrüse. Auf Grund der Stabilität ihrer polaren Struktur und ihrer normalen Funktion stellen sie ein geeignetes in-vitro-Modell für die weitere Forschungsarbeit an der Schilddrüse dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AHN, C.S., ROSENBERG, I.N.
Iodine Metabolism in Thyroid Slices:
Effects of TSH, Dibutyryl Cyclic 3',5'-
AMP, NaF and Prostaglandin E₁
(1970) Endocrinol. 86, 396 - 405
2. AIYOSHI, Y., YAMASHITA, K., YAMASHITA, S., OGATA, E.
Effects of Norepinephrine on Cyclic
Nucleotide Levels in Dog Thyroid Slices
(1978) Endocrinol. 102, 1527 - 1533
3. BIDEY, S.P., MARSHALL, N.J., EKINS, R.P.
A Characterization of Cyclic AMP Release
from Monolayer Cultures of Normal
Human Thyroid Cells
(1982) Act. Endocr. 101, 359 - 364
4. BURTON, K.
A Study of the Conditions and Mechanism
of the Diphenylamine Reaction for the
Colorimetric Estimation of Deoxyribo-
nucleic Acid.
(1956) Biochem. J. 62, 315 - 323
5. CHAMBARD, M., GABRION, J., MAUCHAMP, J.
Influence of Collagen Gel on the Orien-
tation of Epithelial Cell Polarity:
Follicle Formation from Isolated Thyroid
Cells and from Preformed Monolayers
(1981) J. Cell Biol. 91, 157 - 166

6. CHAMBARD, M., VERRIER B., GABRION J., MAUCHAMP J.
Polarization of Thyroid Cells in Culture:
Evidence for the Basolateral Localization of
the Iodide "Pump" and of the Thyroid-stimu
lating Hormone Receptor-Adenyl
Cyclase Complex
(1983) J. Cell. Biol. 96, 1172 - 1177
7. CORLISS DA, E.
Fluorescence of Yeast Vitally Stained
with Ethidium Bromide and Propidium
Jodide
(1981) J. Histochem. Cytochem. 29, 45 - 48
8. DE GROOT L.J., TAUROG, A.
Secretion of Thyroid Hormone
in DE GROOT, L.J. et al.
Endocrinology
(1979) Grune & Stratton, New York
Vol. 1, 343 - 346
9. DENEFF, J.-F., BJÖRKMAN, U., EKHOLM, R.
Structural and Functional Characteristics
of Isolated Thyroid Follicles
(1980) J. Ultra. Res. 71, 185 - 202
10. DUMONT, J.E., BOEYNAEMS, J.M., DECOSTER, C.,
ERNEUX, C., LAMY, F., LECOCQ, R., MOCKEL, J.,
UNGER, J., VAN SANDE, J.
Biochemical Mechanisms in the Control
of Thyroid Function and Growth
(1978) Adv. Cy. Nu. R. 9, 723 - 734

11. DUMONT, J.E., LAMY, F.
The Regulation of Thyroid Cell Metabolism,
Function, Growth and Differentiation
in DE VISSCHER, M.
The Thyroid Gland
(1980) Raven Press, New York, 153 - 167
12. DUMONT, J.E., MIOT, F., ERNEUX, C., COUCHIE, D.,
COCHAUX, P., GERVY-DECOSTER, C.,
VAN SANDE, J., WELLS, J.N.
Negative Regulation of Cyclic AMP Levels
by Activation of Cyclic Nucleotide
Phosphodiesterases: The Example of the
Dog Thyroid
(1984) Adv. Cyclic Nucleotide and
Protein Phosphorylation Res. 16, 325 - 337
13. DUMONT, J.E., TAKEUCHI, A., LAMY, F., GERVY-
DECOSTER, C., COCHAUX, P., ROGER, P.,
VAN SANDE, J., LECOCQ, R., MOCKEL, J.
Thyroid Control: An Example of a Complex
Cell Regulation Network
(1981) Adv. Cy. Nu. R. 14, 479 - 489
14. DUMONT, J.E., VASSART, G.
Thyroid Gland Metabolism and the Action
of TSH
in DE GROOT L.J. et al.
Endocrinology
(1979) Grune & Stratton, New York
Vol 1, 311 - 329

15. EKHOLM, R.
Thyroid Physiology; Anatomy and
Development
in DE GROOT L. J. et al.
Endocrinolgy
(1979) Grune & Stratton, New York
Vol. 1, 305 - 309
16. FAYET, G., MICHEL-BECHET, M., LISSITZKY, S.
Thyrotropin-Induced Aggregation and
Reorganization into Follicles of
Isolated Porcine-Thyroid Cells in Culture
(1971) Eur. J. Biochem. 24, 100 - 111
17. GARBI, C., WOLLMAN, S.H.
Basal Lamina Formation on Thyroid
Epthelia in Separated Follicles in
Suspension Culture
(1982) J. Cell. Biol. 94, 489 - 492
18. GARBI, C., WOLLMAN, S.H.
Ultrastructure and some other Properties
of Inverted Thyroid Follicles in
Suspension Culture
(1982) Exp. Cell Res. 138, 343 - 353
19. GÄRTNER, R., KEWENIG, M., HORN, K.,
SCRIBA, P.C.
A New Principle of Thyroxine (T_4) and
Trijodthyronine (T_3) Radioimmunoassay
in Unextracted Serum Using Antisera with
Binding Optima at Extreme pH Ranges
(1980) J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
18, 571 - 577

20. GILMAN, A.G., RALL, T.W.
Factors Influencing Adenosine 3',5'-
Phosphate Accumulation in Bovine
Thyroid Slices
(1968) J. Biol. Chem. Vol. 243, 22, 5867 - 5871
21. HALMI, N.S., GRANNER, D.K., DOUGHMAN, D.J.,
PETERS, B.H., MÜLLER, G.
Biphasic Effect of TSH on Thyroidal
Iodide Collection in Rats
(1960) Endocrinol. 67, 70 - 81
22. HANAFUSA, T., PUJOL-BORRELL, R., CHIOVATO, L.,
HAMMOND, L.J., BOTTAZO, G.F.
Culture of Human Thyroid Follicles with
Normal and Reversed Polarity
(1982) Ann. d'Endocrin. 43, 30
23. HANAFUSA, T., PUJOL-BORRELL, R., CHIOVATO, L.,
DONIACH, D., BOTTAZO, G.F.
In Vitro and in Vivo Reversal of Thyroid
Epithelial Polarity: Its Relevance for
Autoimmune Thyroid Disease
(1984) Clin. Exp. Im. 58, 639 - 646
24. HERZOG, V., MILLER, F.
Membrane Retrieval in Epithelial Cells
of Isolated Thyroid Follicles
(1979) Eur. J. Cell Biol. 19, 203 - 215
25. HERZOG, V., MILLER, F.
Structural and Functional Polarity of
Inside-out Follicles Prepared from
Pig Thyroid Gland
(1981) Eur. J. Cell Biol. 24, 74 - 84

26. HERZOG, V.
Transcytosis in Thyroid Follicle Cells
(1983) J. Cell Biol. 97, 607 - 617
27. HOLMES, S.D., FIELD, J.B.
The Role of Cyclic Nucleotides in the
Thyroid Gland
In KEBABIAN, J.W., NATHANSON, J.A.
Handbook of Experimental Pharmacology
(1982) Springer Verlag, Berlin Heidelberg
New York, Vol. 58/II, 567 - 597
28. HORN, K.
Trijodthyronin (T_3): Zur Bestimmung und
pathophysiologischen Bedeutung
(1976) Urban und Schwarzenberg
München Berlin Wien
29. INOUE, K., HORIUCHI, R., KONDO, Y.
Effect of Thyrotropin on Cell Orientation
and Follicle Reconstruction in Rotated
Suspension Culture of Hog Thyroid Cells
(1980) Endocrinol. 107, 1162 - 1168
30. KARLSSON, F.A., WESTERMARK, K., WESTERMARK, B.
Functional Properties of Porcine-Thyroid
Follicles in Suspension
(1982) Mol. C. Endoc. 28, 99 - 112
31. KERKOF, P.R., LONG, P.J., CHAIKOFF, I.L.
In Vitro Effects of Thyrotropic Hormone.
I. On the Pattern of Organization of
Monolayer Cultures of Isolated Sheep
Thyroid Gland Cells.
(1964) Endocrinol. 74, 170 - 179

32. KUCHLER, R.J.
Biochemical Methods in Cell Culture
and Virology
(1977) Dowden, Hutchinson and Ross
Stroudsburg, 19
33. LEJEUNE, P.J., MARRIQ, C., ROLLAND, M.,
LISSITZKY, S.
In Vitro and in Vivo Iodination of
Human Thyroglobulin in Relation to
Hormone Release
(1983) FEBS-Letters 156, 77 - 82
34. LISSITZKY, S., FAYET, G., GIRAUD, A.,
VERRIER, B., TORRESANI, J.
Thyrotropin-Induced Aggregation and
Reorganization into Follicles of
Isolated Porcine-Thyroid Cells
(1971) Eur. J. Biochem. 24, 88 - 99
35. MAAYAN, M.L., VOLPERT, E.M., FROM, A.
Norepinephrine and Thyrotropin Effects
on the Thyroid in Vitro: Simultaneous
Stimulation of Iodine Organification
and Antagonism of Thyroxine Release
(1981) Endocrinol. 109, 930 - 934
36. MARSCHNER, I., DOBRY, H., ERHARDT, F.,
LANDERSDORFER, T., POPP, B., RINGEL, C.,
SCRIBA, P.C.
Berechnung radioimmunologischer
Meßwerte mittels Spline-Funktionen
(1974) Ärztl. Lab. 20, 184

37. MARSHALL, N.J., VON BORCKE, S., MALAN, P.G.
Studies on Isoproterenol Stimulation of
Adenyl Cyclase in Membrane Preparations
from the Bovine Thyroid
(1975) Endocrinol. 96, 1520 - 1524
38. MAUCHAMP, J., MARGOTAT, A., CHAMBARDE, M.,
CHARRIER, B., REMY, L., MICHEL-BECHET, M.
Polarity of Three-Dimensional Structures
Derived from Isolated Hog Thyroid Cells
in Primary Culture
(1979) Cell. Tis. Re. 204, 417 - 430
39. MELAMED, M.R.
Preliminary Evaluation of Acridine
Orange as a Vital Stain for Automatic
Differential Leucocyte Counts
(1972) Am. J. Clin. P. 57, 95 - 102
40. MIZUKAMI, Y., MATSUBARA, F., MATSUKAWA, S.
Localization of Adenylate Cyclase and
5'-Nucleotidase Activities in
Human Thyroid Follicular Cells
(1982) Histochemis. 74, 9 - 19
41. MURAKI, T., NAKAKI, T., KATO, R.
Predominance of α_2 -Adrenoceptors in
Porcine Thyroid: Biochemical and
Pharmacological Correlations
(1984) Endocrinol. 114, 1645 - 1651
42. NEVE, P., RODESCH, F.R., DUMONT, J.E.
Electron Microscopy of Isolated Sheep
Thyroid Cells
(1968) Exp. Cell Re. 51, 68 - 78

43. NITSCH, L., WOLLMAN, S.H.
Suspension Culture of Separated Follicles
Consisting of Differentiated Thyroid
Epithelial Cells
(1980) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA Vol. 77, 1, 472 - 476
44. NITSCH, L., WOLLMAN, S.H.
Ultrastructure of Intermediate Stages in
Polarity Reversal of Thyroid Epithelium
in Follicles in Suspension Culture
(1980) J. Cell Biol. 86, 875 - 880
45. PHILLIPS, H.J.
Dye Exclusion Tests for all Viability
in KRUSE, P.F. et al.
Tissue Culture
(1973) Academic Press, New York, 407 - 408
46. RAPOPORT, B.
Dog Thyroid Cells in Monolayer Tissue
Culture: Adenosine 3',5'-Cyclic Mono-
phosphate Response to Thyrotropic Hormone
(1976) Endocrinol. 98, 1189 - 1197
47. ROJKKIND, M., GATMAITAN, Z., MACKENSEN, S.,
GIAMBRONE, M.A., PONCE, P., REID, L.M.
Connective Tissue Biomatrix: Its Isolation
and Utilization for Long-Term Cultures
of Normal Rat Hepatocytes
(1980) J. Cell Biol. 87, 255 - 263
48. SHERWIN, J.R., MILLS, I.
Epinephrine Inhibits Thyrotropin-Stimulated
Adenosine 3',5'-Monophosphate Accumulation
in Cat Thyroid Tissue
(1980) Endocrinol. 106, 28 - 34

49. SHERWIN, J.R., TONG, W.
Thyroidal Autoregulation
Iodide-Induced Suppression of Thyrotropin-
Stimulated Cyclic AMP Production and
Iodinating Activity in Thyroid Cells
(1975) Biochim. Biophys. Acta 404, 30 - 39
50. SPAULDING, S.W., BURROW, G.N.
 β -Adrenergic Stimulation of Cyclic AMP
and Protein Kinase Activity in the Thyroid
(1975) Nature 254, 347 - 349
51. TAUROG, A.
Hormone Synthesis
in DE GROOT L.J. et al.
Endocrinology
(1979) Grune & Stratton, New York
Vol. 1, 331 - 342
52. TOCCAFONDI, R.S., BRANDI, M.L., ROTELLA, C.M.,
ZONEFRATI, R.
Studies of Catecholamine effect on Cyclic
AMP in Human Cultured Thyroid Cells: Their
Interaction with Thyrotropin Receptor
(1983) Acta Endocrinol. 102, 62 - 67
53. VALENTE, W.A., VITTI, P., KOHN, L.D.,
BRANDI, M.L., ROTELLA, C.M., TOCCAFONDI, R.,
TRAMONTANO, D., ALOJ, S.M., AMBESI-
IMPIOMBATO, F.S.
The Regulationship of Growth and Adenylate
Cyclase Activity in Cultured Thyroid Cells:
Separate Bioeffects of Thyrotropin
(1983) Endocrinol. 112, 71 - 79

54. VAN SANDE, J., GRENIER, G., WILLEMS, C., DUMONT, J.E.
Inhibition by Iodide of the Activation of the
Thyroid Cyclic 3',5'-AMP System
(1975) Endocrinol. 96, 781 - 786
55. WADELEUX, P.A., ETIENNE-DECERF, J., WINAND, R.J.,
KOHN, L.D.
Effects of Thyrotropin on Iodine Metabolism
of Dog Thyroid Cells in Tissue Culture
(1978) Endocrinol. 102, 889 - 902
56. WEISS, S.J., PHILP, N.J., GROLLMAN, E.F.
Iodide Transport in a Continuous Line of
Cultured Cells from Rat Thyroid
(1984) Endocrinol. 114, 1090 - 1098
57. WEISS, S.J., PHILP, N.J., AMBESI-IMPIOMBATO, F.S.,
GROLLMAN, E.F.
Thyrotropin-Stimulated Iodide Transport
Mediated by Adenosine 3',5'-Monophosphate
and Dependent on Protein Synthesis
(1984) Endocrinol. 114, 1099 - 1107
58. WEISS, S.J., PHILP, N.J., GROLLMAN, E.F.
Effect of Thyrotropin on Iodide Efflux
in FRTL-5 Cells Mediated by Ca^{2+}
(1984) Endocrinol. 114, 1108 - 1113
59. WILSON, B., RAGHUPATHY, E., TONOUE, T., TONG, W.
TSH-like Actions of Dibutyryl-cAMP on
Isolated Bovine Thyroid Cells
(1968) Endocrinol. 83, 877 - 884

60. YAMASHITA, K., FIELD, B.

Elevation of Cyclic Guanosine 3',5'-
Monophosphate Levels in Dog Thyroid
Slices Caused by Acetylcholine and
Sodium Fluoride

(1972) J. Biol. Chem. Vol.247, 21, 7062 - 7066

Lebenslauf

Name:	Dorothee Stübner
Geburtsdatum:	19.8.1960
Geburtsort:	Paderborn
Eltern:	Dr. med. Veronika Stübner, geb. Leiß, praktische Ärztin Dr. med. Christian Stübner, Arzt für Innere Medizin
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	
1966 - 1970	Besuch der Grundschule in Puchheim-Bhf.
1970 - 1979	Besuch des humanistischen Theresien- Gymnasiums in München, Wahl des neusprachlichen Zweiges
Juni 1979	Abitur, Hauptfächer Mathematik und Französisch
Studium:	
November 1979	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universi- tät in München
August 1981	Ärztliche Vorprüfung
August 1982	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September/ Oktober 1982	Famulatur im Veterans Administration Medical Center in Cleveland, Ohio/USA
Mai 1983	Beginn der Dissertationsarbeit unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. K. Horn, Herrn Dr. med. R. Gärtner und Herrn Dr. med. W. Greil in der Endokrinologischen Abteilung (Frau Prof. Dr. med. C.R. Pickardt) an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians Universität in München
August 1984	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1984	Beginn des Praktischen Jahres, Wahlfach: Pädiatrie
Oktober/ November 1985	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prü- fung und Approbation als Ärztin

